

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**Desarrollo de un método de extracción con Solventes Supramoleculares
(SUPRAS) para la determinación de colesterol por Cromatografía de Gases
con Detector de Ionización de Llama (GC-FID).**

Disertación de grado previa a la obtención del Título de Licenciada en Ciencias

Químicas con mención en Química Analítica

CINTHYA PAMELA DELGADO SÁNCHEZ

Quito, 2015

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica, de la candidata Cinthya Pamela Delgado Sánchez ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Fecha:

M.Sc. Eliza Jara

DEDICATORIA

Criar a los hijos sola supone el doble de trabajo, el doble de estrés y el doble de lágrimas. Pero también, supone el doble de abrazos, el doble de amor y el doble de orgullo. Como cada triunfo que he alcanzado, éste también es tuyo mami...

Sin dejarte a un lado a ti abuelita Ester, que donde quiera que te encuentres, esto también es para ti.

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo a Dios, por haberme dado fortaleza, paciencia y sabiduría cada segundo durante esta gran experiencia. Porque cuando todo se venía abajo, fue mi refugio y mi aliento para no morir en el intento.

A mi familia: Fran, Alejita, Mateito, abuelita Carmen, papi; por entregarme su apoyo, con palabras de aliento, un mensaje o una llamada; pero sobre todo, su amor incondicional que es indispensable para conseguir cada meta propuesta en mi vida.

A mis pequeñas hermanitas, Ari y Nicko, por las ocurrencias, travesuras y grandes enseñanzas, ustedes son mi inspiración para continuar cosechando éxitos en mi camino.

A mi mami, Sory, mi amiga y confidente. Gracias mami por jamás soltar mi mano, porque aunque estemos lejos, estoy segura que siempre estás aquí. Estoy segura que sin ti, no estuviera donde estoy ahora.

A ti Xavi, por ser mi amigo, mi pañuelo de lágrimas, mi cómplice, mi amor. Por escucharme y alentarme, porque con una tan sola palabra hiciste que me sienta segura en este difícil pero gratificante camino.

A mi directora de disertación, M.Sc. Eli Jara, por haber aceptado sin dudarlo ni un segundo ser mi guía durante este proyecto. A pesar de los obstáculos presentados, jamás se dio por vencida. Mi admiración y sincero agradecimiento a usted profe Eli.

Al Máster Pablito Pozo, por abrirme las puertas de su laboratorio, pero sobre todo, brindarme su amistad.

A mis compañeros, especialmente Christian y Pedro, por su paciencia, amistad y enseñanzas, tanto dentro como fuera del aula.

Finalmente, a la Escuela de Ciencias Químicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por haber sido una pieza fundamental en mi vida profesional.

A veces miro al cielo, sonrío y digo: “Yo sé que fuiste tú”

¡Gracias Dios!

ÍNDICE

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE ANEXOS	XIII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XVI
INTRODUCCIÓN.....	XVII
CAPÍTULO I	1
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 QUÍMICA SUPRAMOLECULAR.....	1
1.1.1 ENLACE INTERMOLECULAR NO COVALENTE	1
1.1.2 SISTEMAS SUPRAMOLECULARES	4
1.1.3 EXTRACCIONES CON AGREGADOS MOLECULARES	8
1.1.4 SURFACTANTE O TENSOACTIVO.....	9
.....	13
1.1.5 SOLVENTES SUPRAMOLECULARES	13
1.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES	23
1.2.1 COMPONENTES DE UN EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES	24
1.3 PARÁMETROS DE OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO	28
1.3.1 SELECTIVIDAD	28
1.3.2 PRECISIÓN	28
1.3.3 EXACTITUD	29
1.3.4 EFECTO MATRIZ.....	30
CAPÍTULO II.....	31
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
2.1. MUESTREO.....	31

2.2.	DESARROLLO DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL	32
2.3.	SELECCIÓN DEL SUPRAS PARA LA EXTRACCIÓN DE COLESTEROL.....	34
➤	MATERIALES	35
➤	EQUIPOS	35
2.3.1.	EVALUACIÓN DE LA PROPORCIÓN THF/H ₂ O	38
2.3.2.	EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTE.	
	39	
2.4.	OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN CON SUPRAS..	39
2.5.	EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO	41
2.5.1.	SELECTIVIDAD	41
2.5.2.	EXACTITUD	42
2.5.3.	PRECISIÓN	44
2.5.4.	EFEECTO MATRIZ.....	45
2.6.	ANÁLISIS DE MUESTRAS DE HUEVOS DE GALLINA.....	47
2.6.1.	CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES	47
	CAPÍTULO III	50
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
3.1.	OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	50
3.2.	SELECCIÓN DEL SUPRAS PARA LA EXTRACCIÓN DE COLESTEROL.....	52
3.3.	EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO	67
3.3.1.	SELECTIVIDAD	67
3.3.2.	EXACTITUD	69
3.3.3.	PRECISIÓN	72
3.3.4.	EFEECTO MATRIZ.....	74
3.4.	CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL EN MUESTRAS COMERCIALES DE HUEVOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	78
	CAPÍTULO IV.....	83
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	83
4.1.	CONCLUSIONES.....	83

4.2. RECOMENDACIONES	85
BIBLIOGRAFÍA	87
ANEXOS	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Tipos de Solventes Supramoleculares [18].	18
Tabla 2.1. Codificación de muestras de huevos de gallina utilizados en el estudio	32
Tabla 2.2. Especificaciones de la columna que se utilizó para el análisis cromatográfico.....	33
Tabla 2.3. Variables y niveles evaluados para la selección del solvente supramolecular.	34
Tabla 2.4. Variables y niveles evaluados para la extracción de colesterol con SUPRAS.	40
Tabla 3.1. Optimización del método cromatográfico para la determinación de colesterol en huevos de gallina.	50
Tabla 3.2. Áreas correspondientes al pico del colesterol en función de la proporción de THF/H ₂ O con cada surfactante.....	53
Tabla 3.3. Áreas correspondientes al pico del colesterol en función de la concentración de surfactante en el SUPRAS.	56
Tabla 3.4. Análisis de varianza de la optimización del porcentaje de surfactante en el SUPRAS.....	58
Tabla 3.5. Áreas correspondientes al pico de colesterol en función del volumen de SUPRAS.....	59
Tabla 3.6. Análisis de varianza de volúmenes de SUPRAS.....	61
Tabla 3.7. Áreas correspondientes al pico de colesterol en función del tiempo de agitación.	62
Tabla 3.8. Análisis de varianza del tiempo de agitación.	63

Tabla 3.9. Áreas correspondientes al pico de colesterol en función del tiempo de centrifugación.	65
Tabla 3.10. Análisis de varianza del tiempo de centrifugación.	66
Tabla 3.11. Parámetros seleccionados para la extracción de colesterol con SUPRAS.	67
Tabla 3.12. Determinación de la exactitud del método de extracción de colesterol en base de la muestra IND.	70
Tabla 3.13. Determinación de la exactitud del método de extracción de colesterol en base de la muestra CB.	71
Tabla 3.14. Determinación de la precisión del método de extracción de colesterol en base de la muestra IND.	72
Tabla 3.15. Determinación de la precisión del método de extracción de colesterol en base de la muestra CB.	73
Tabla 3.16. Curva de calibración de colesterol obtenida mediante CG-FID.	79
Tabla 3.17. Concentración de colesterol en muestras comerciales de huevos de gallina.	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Clasificación de Surfactantes para el uso de extracciones con SUPRAS....	13
Figura 1.2 Proceso de autoensamblaje en la formación de solventes supramoleculares.	14
Figura 1.3 Representación simplificada de un agregado molecular de tipo micela inversa	16
Figura 1.4 Coacervado formado por ácido decanoico y THF. Estructura globular [5]..	17
Figura 1.5 Ilustración del proceso autoensamblaje durante la formación del solvente supramolecular (microscopía de luz -campo claro).....	17
Figura 1.6 Aplicación de solventes supramoleculares en varias matrices a través de micelas acuosas (surfactantes no iónicos).	22
Figura 1.7. Aplicación de solventes supramoleculares en varias matrices a través de micelas acuosas (surfactantes iónicos)	22
Figura 1.8. Aplicación de solventes supramoleculares en varias matrices a través de micelas inversas.	23
Figura 1.9. Diagrama de un cromatógrafo de gases [36].	25
Figura 3.1. Relación de volumen de SUPRAS y área del pico correspondiente a colesterol, obtenido por GC-FID.	60
Figura 3.2. Relación del tiempo de agitación de SUPRAS y área del pico correspondiente a colesterol, obtenido por GC-FID.....	63
Figura 3.3. Relación del tiempo de centrifugación y área del pico correspondiente a colesterol, obtenido por GC-FID.	65
Figura 3.4. Cromatogramas superpuestos del blanco SUPRAS (negro), estándar de colesterol (azul) y extracto SUPRAS de una muestra comercial (verde).....	68

Figura 3.5. Vista lateral de la formación del sobrenadante producto de la adición de THF a una muestra de clara de huevo de gallina.....	75
Figura 3.6. Cromatograma de la muestra de aceite fortificada con 625 μ L de una solución de 40000 mg/L de estándar de colesterol (escala 100 pA).	75
Figura 3.7. Cromatograma de la muestra de aceite fortificado con 500 μ L de una solución de 16000 mg/L de estándar de colesterol (escala 600 pA).	76
Figura 3.8. Cromatograma de la muestra de aceite fortificado con 200 μ L de una solución de 40000 mg/L de estándar de colesterol (escala 600 pA).	77
Figura 3.9. Curva de calibración para la cuantificación de muestras de huevo de gallina por CG-FID.	79
Figura 3.10. Comparación de la concentración de colesterol en muestras comerciales de huevo de gallina.....	82

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. CERTIFICADO DEL ESTÁNDAR DE COLESTEROL	95
ANEXO 2. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE COLESTEROL MUESTRA CB (SEIDLABORATORY)	96
ANEXO 3. CERTIFICADO ANÁLISIS DE COLESTEROL MUESTRA IND (SEIDLABORATORY)	97
ANEXO 4. TABLA DE DISTRIBUCIÓN T DE STUDENT	98
ANEXO 5. TABLA DE DISTRIBUCIÓN F DE FISHER	100
ANEXO 6. CROMATOGRAMAS DE ESTÁNDARES (800-2800 mg/L).....	102
ANEXO 7. CROMATOGRAMAS DE LAS MUESTRAS DE HUEVOS.....	105
ANEXO 8. FOTOGRAFÍAS DE LABORATORIO	110

RESUMEN

Uno de los pasos más importantes en el análisis químico es el tratamiento de la muestra. Son varias las propuestas que se han expuesto para reemplazar las exhaustivas extracciones con grandes volúmenes de solvente, una de ellas es a través del uso de solventes supramoleculares o denominados SUPRAS. De esta manera, en la presente disertación se evaluó la eficiencia de la extracción de colesterol en muestras de huevo de gallina. La formación del agregado molecular de tipo micela inversa, se llevó a cabo a través del auto-ensamblaje del n-octanol 4% (v/v) (surfactante) y la mezcla de los solventes tetrahidrofurano-agua en proporción 50/50 (v/v). Bajo estas condiciones, se llevó a cabo la optimización del método de extracción, evaluando algunas condiciones como: volumen de SUPRAS, tiempo de agitación y tiempo de centrifugado; para los cuales se determinaron como óptimos: 400 μ L, 10 minutos y 15 minutos respectivamente. A continuación, se realizó la cuantificación de colesterol en muestras de huevos criollos y procesados de la ciudad de Quito a través de Cromatografía de Gases con detector de Ionización de Llama (GC-FID siglas en Inglés). De esta manera, se determinó que una de las muestras de huevos criollos posee la mayor cantidad de colesterol con un promedio de $357 \pm 29,35$ mg por 100 g de muestra, y por el contrario, los huevos enriquecidos con omega 3 poseen bajas concentraciones de colesterol con $176 \pm 42,17$ mg por 100 g de muestra. Finalmente, y de acuerdo a los criterios de aceptabilidad (selectividad y exactitud), se determinó que el método de extracción con SUPRAS es adecuado para la extracción de colesterol en huevos de gallina.

Palabras clave: solventes supramoleculares, auto-ensamblaje, colesterol, huevo, extracción

ABSTRACT

One of the most important steps in chemical analysis is the sample treatment. There are several proposals that have been exposed to replace the exhaustive extraction with large volumes of solvent, one of them is using supramolecular solvents also called SUPRAS. In this dissertation, this extraction technique was applied to cholesterol in chicken egg, in order to evaluate its efficiency. The formation of the molecular aggregate as a reverse micelle, was accomplished through self-assembly between 4% (v/v) n-octanol (surfactant) and the mixture of the solvents tetrahydrofurane-water 50/50 (v/v). Under these conditions, the extraction method was optimized, evaluating some parameters such as: volume of SUPRAS, stirring time and centrifugation time; for which the optimum values were: 400 μ L, 10 minutes and 15 minutes, respectively. Then, the cholesterol's quantifying was performed in real samples commercialized in Quito, by Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID). Thus, the results showed that one sample of free-range eggs had the largest amount of cholesterol with an average of $357 \pm 29,35$ mg per 100 g of sample, as opposed to eggs enriched with omega-3 eggs with low concentrations $176 \pm 42,17$ mg per 100 g of sample. Finally, according to acceptability criteria (selectivity and accuracy), demonstrated that SUPRAS extraction is appropriate for extraction of cholesterol from chicken eggs.

Keywords: supramolecular solvents, self-assembly, cholesterol, egg, extraction.

INTRODUCCIÓN

Con el objetivo de llevar a cabo el análisis químico de un determinado analito, independiente de la técnica que se utilice, la preparación de la muestra siempre será un paso determinante dentro del análisis, pues será éste el que permita obtener resultados confiables sobre el analito de interés. Son muy poco frecuentes los casos en los que la muestra no necesite de un tratamiento antes de ser medida, pues este paso contribuye a que el analito se encuentre en la concentración y/o forma química adecuadas para la técnica analítica seleccionada, o simplemente para evitar interferencias existentes que impidan evaluar el analito deseado.

En el transcurso de los últimos años, las nuevas tecnologías enfocadas en el desarrollo de procesos de tratamiento de muestras, han tomado como punto focal el uso minoritario de solventes orgánicos, pues algunos de éstos debido a su alta toxicidad, se vuelven sustancias que contribuyen a la contaminación atmosférica, y por lo tanto, su uso se ve reducido para el proceso de extracción o purificación de una muestra. Como respuesta positiva a este tipo de desventajas que conlleva el uso de algunos solventes orgánicos convencionales, se ha propuesto el uso de disolventes alternativos como: fluidos supercríticos, líquidos iónicos, y solventes supramoleculares [1-3].

El uso de solventes supramoleculares, denominados también SUPRAS, se ha convertido en una técnica de extracción frecuentemente usada por investigadores y laboratorios químicos, pues a través de los resultados que conllevan su uso, han mostrado afinidad para el tratamiento o pre-tratamiento de una muestra.

Un solvente supramolecular corresponde a un líquido inmiscible en agua formado por agregados supramoleculares de tipo: micelas, micelas inversas o vesículas, que se dispersan en una fase continua, y que se generan a partir de disoluciones anfifílicas mediante un proceso secuencial de autoensamblaje. [4]. Este proceso se lleva a cabo en dos etapas: la primera, comprende la formación de agregados tridimensionales de manera espontánea por parte de las moléculas anfifílicas, ya sea en forma de vesículas o micelas; a continuación, éstos agregados se auto-ensamblan, por la recepción de un estímulo externo (adición de agua) formando agregados más grandes, por lo que, logran separarse de la solución coloidal por un fenómeno conocido como coacervación, dando lugar a una nueva fase líquida o disolvente supramolecular [3].

Las ventajas que ofrecen éste tipo de disolventes frente a los solventes orgánicos convencionales comprenden: variedad de compuestos anfifílicos en la industria y por tanto, despliegan una gama de solventes para elegir de acuerdo a la aplicación; facilidad con la que los SUPRAS pueden llegar a auto-ensamblarse durante su síntesis; gran poder de solvatación con diversas moléculas orgánicas e inorgánicas; y finalmente, la presencia de distintos grupos funcionales en los solventes supramoleculares, lo cual permite obtener una extracción más eficiente [5].

En los últimos años, ha entrado en debate lo beneficioso o perjudicial que puede resultar consumir huevos de gallina, debido a la presencia de colesterol en su composición. Es así, que se ha considerado importante especificar el contenido de este compuesto en la información nutricional de los alimentos procesados. En relación a otros alimentos, la

presencia de colesterol en huevos de gallina es considerablemente alta, pues corresponde a un valor entre 350 a 500 mg por ración (100g de la parte comestible que corresponde al consumo de dos huevos medianos). Dado que para mantener una buena salud se recomienda una concentración por debajo de 200 mg diarios de colesterol en sangre, es importante que se tome en cuenta la cantidad de huevos que una persona puede consumir diariamente [6]. Así mismo, resulta esencial conocer que únicamente el 20% del colesterol presente en el organismo de una persona proviene de los alimentos que la misma ingiera, pues el 80% restante será el organismo quien lo sintetice [7].

Con el uso de solventes supramoleculares como reemplazo a las extracciones que se usan comúnmente para tratar una muestra, se consigue un ahorro de tiempo significativo durante en el análisis y con resultados eficientes. Sin embargo, es importante poner en consideración del investigador el uso de estos disolventes, pues a pesar de que las cantidades de uso son mínimas, algunos de ellos corresponden a químicos tóxicos.

En esta disertación se desarrolló un método de extracción de colesterol en huevos de gallina a través del uso de un solvente supramolecular (SUPRAS) adecuado. Para ello, fue necesario investigar el estado del arte y fundamentos de los solventes supramoleculares, información expuesta en el Capítulo I; seguidamente se probaron diferentes SUPRAS y se evaluó su eficiencia extractiva con la metodología señalada en el Capítulo II. Los resultados obtenidos son discutidos en el Capítulo III, antes de finalizar con las conclusiones de este estudio en la última sección.

El enfoque que se le ha dado a esta disertación fue evaluar la eficiencia que conlleva el uso de los SUPRAS en matrices alimenticias, específicamente en huevos. De esta manera y siendo el colesterol uno de los componentes principales en el huevo, se busca conocer el comportamiento de este compuesto al entrar en contacto con solventes supramoleculares, proceso que se verificó mediante la lectura de los extractos por Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Llama.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Química Supramolecular

La química supramolecular deriva su término del latín *supra* que significa “sobre” o “por encima de” [8]. Esta ciencia se ocupa del diseño, la síntesis, y el estudio de estructuras moleculares unidas por uniones no covalentes [9]. En la actualidad la Química Supramolecular se considera un área de gran importancia para la Química Analítica, pues aporta con la innovación de técnicas que ayudan a identificar de manera cualitativa y/o cuantitativa un analito.

1.1.1 Enlace intermolecular no covalente

Son enlaces más débiles que los enlaces covalentes, (su energía de enlace es típicamente de 10 a 100 veces menor), por lo que se tienen la propiedad de ser flexibles, además de que se pueden crear y romper con facilidad. Pero si bien, individualmente son débiles, colectivamente pueden resultar tanto o más fuertes que un enlace covalente [10]. Los cuatro grandes grupos de interacciones no covalentes son: fuerzas de van der Waals, enlace o puente de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas.

- **Fuerzas de van der Waals**

El conjunto de fuerzas que se establecen entre moléculas o átomos, y que no se pueden considerar como enlaces covalentes o enlaces puramente iónicos se conoce colectivamente como "fuerzas de Van der Waals" [11]. Son de tipo atractivo o repulsivo. Constituyen fuerzas de atracción débiles que se establecen entre moléculas eléctricamente neutras (polares y no polares).

- **Puente de hidrógeno**

Este enlace consiste en una atracción intermolecular causada por el hidrógeno unido a un elemento electronegativo [12]. Algunas particularidades que presentan ciertas moléculas se deben a la débil fuerza de atracción si se compara con los enlaces covalentes. El requisito de direccionalidad de ésta lo hace selectivo al momento de formar complejos, por lo tanto dentro de la química supramolecular, es considerada la interacción de mayor importancia ya que es responsable de la formación de ensamblajes altamente organizados y estables; sin embargo, es difícil estudiarlo en sistemas acuosos debido a que el agua es un excelente donador y aceptor de puente de hidrógeno.

- **Interacciones hidrofóbicas**

Cuando una molécula es incapaz de interactuar con las moléculas de agua se dice que existe hidrofobicidad. De esta manera, las moléculas que son hidrofóbicas se unen para reducir el número de moléculas de agua que intentan estar asociadas con las moléculas hidrofóbicas. Este fenómeno se denomina efecto hidrofóbico y es el responsable de que

determinados lípidos formen agregados supramoleculares. Una interacción hidrofóbica se puede establecer en el interior de una micela durante la digestión de los lípidos [13].

- **Interacciones electrostáticas**

Las fuerzas electrostáticas permiten la atracción electrostática entre dos moléculas. Dentro de este grupo se encuentran las fuerzas: ión-ión, ión-dipolo, ión-dipolo inducido y dipolo-dipolo, tal y como se mencionan a continuación.

- **Fuerzas ión-ión**

Se refiere a aquella fuerza entre iones de distinta carga. Se lo encuentra generalmente en la unión de aminoácidos de una proteína, así como en la unión de ácidos nucleicos con proteínas. En la química supramolecular existen muchos sistemas que forman complejos estables mediante estas interacciones. El reconocimiento de péptidos o nucleótidos generalmente se lleva a cabo mediante la formación de puentes salinos que involucran los grupos carboxilatos y fosfatos con anfitriones como ciclodextrinas con grupos amina [14].

- **Fuerzas ión-dipolo**

Corresponde a la unión que se establece entre un ión y una molécula polar. Esta interacción puede tener lugar de dos maneras: un catión atrae la carga parcial negativa de un dipolo; un anión atrae la carga parcial positiva de un dipolo [15]. Un ejemplo a nivel supramolecular es la interacción entre un éter con un derivado de amonio, donde

la interacción se establece entre los oxígenos del éter y el hidrógeno del huésped cargado positivamente [14].

➤ **Fuerzas dipolo-dipolo**

Se manifiesta entre la unión de moléculas polares, específicamente entre el extremo positivo de una y el extremo negativo de otra. Los sistemas que más frecuentemente se detectan como formadores de estas interacciones son neutros polares y por lo regular son los que presentan grupos carbonilo, nitro y aminas, como por ejemplo $C=O/C=O$, $C=O/CN$, $C=O/NO_2$, $C=N$ [14].

1.1.2 Sistemas Supramoleculares

Un sistema supramolecular es una entidad formada a partir de dos o más moléculas unidas a través de enlaces intermoleculares de tipo no covalente. Estos sistemas supramoleculares se dividen en dos grandes grupos: supramoléculas y agregados moleculares.

1.1.2.1 Supramolécula

El término supramolécula se refiere a la organización de dos o más moléculas (anfitrión y huésped) unidas entre sí a través de enlaces no covalentes [16].

- **Molécula anfitriona**

Se la conoce también como receptor. Constituye una molécula grande misma que presenta en su estructura alguna cavidad en donde se puede introducir total o parcialmente una molécula huésped [14]. Su origen puede ser de origen natural, semi-sintético o completamente sintético. Sin embargo, existen también anfitriones que no poseen cavidad, es decir, acíclicas o de cadena abierta que son conocidas como pinzas o podandos. Estas moléculas presentan la ventaja con respecto a las especies macrocíclicas de poseer mayor flexibilidad y por lo tanto mejor disposición al momento de complejarse con un determinado huésped [14].

- **Molécula huésped**

Denominada también sustrato, es usualmente el componente más pequeño. Esta molécula huésped es envuelta (total o parcial) por un receptor u hospedero, e integrada en una cavidad intermolecular que reconoce este sustrato [17].

1.1.2.2 Agregado Molecular

Un agregado molecular es la unión de partículas estructurales que dan lugar a la formación de partículas de mayor tamaño. Una característica importante en cuanto a los agregados moleculares es que la mayoría de las moléculas que los conforman poseen una parte hidrófoba y una hidrofílica, permitiéndoles tener regiones con diferente polaridad, acidez y viscosidad, propiedades que determinarán la región de solubilización del soluto dentro del sistema supramolecular [18]. Un agregado molecular se lleva a

cabo a través de dos etapas fundamentales, el reconocimiento de la(s) moléculas y su autoensamblaje. Dentro de este tipo de estructuras se encuentran los solventes supramoleculares.

1.1.2.3 Reconocimiento molecular

Se refiere a la interacción o enlace (de tipo no covalente) que se establece entre una molécula huésped o sustrato y una molécula receptora, de tal manera que se forme un complejo receptor-sustrato.

El reconocimiento molecular es un concepto de la Química Supramolecular que corresponde a la capacidad que tienen las moléculas de reconocerse mutuamente, y viene definido por la energía y la información involucradas en el enlace (no covalente); además de la selección del sustrato por una molécula receptora determinada. Sin embargo, no todas las moléculas serán ideales para formar el complejo. La condición que se requiere para dar lugar a la unión, es tener lugares espaciales y químicamente complementarios entre moléculas. En esta primera etapa lo que se desea lograr también es que el complejo adquiera estabilidad propia, característica que se adquiere siempre y cuando se cumpla uno de los dos apartados: si la molécula receptora no requiere un cambio conformacional, o si el anfitrión contiene múltiples sitios de unión covalentemente unidos. Por otro lado, los disolventes también influyen en este proceso de unión selectiva [3].

1.1.2.4 Procesos de auto-ensamblaje (*Self-assembly*)

Este término se define como el proceso que permite la formación de un agregado supramolecular de manera espontánea partiendo de sus componentes iniciales, mismos que le otorgan estructura y propiedades al agregado que se forma. Hay que tomar en cuenta que el proceso de auto-ensamblaje implica auto-organización y reversibilidad [19]. El primero se refiere a la información que procede de la molécula anfitriona y la huésped, y el segundo, a la capacidad de volver a su estado anterior. Entonces, el auto-ensamblaje permite que las moléculas se asocien para formar un agregado supramolecular de mayor tamaño y con una estructura más compleja, todo esto con la ayuda del proceso de reconocimiento molecular, proceso que tiene lugar en el auto-ensamblaje de manera repetitiva consiguiendo la formación de un complejo supramolecular tridimensional.

Del mismo modo, los componentes huéspedes tienen que ser incrustados en un entorno adecuado (por ejemplo una solución), para las fuerzas intermoleculares actúen [3]. El medio en el que se desarrolla el auto-ensamblaje puede ser manipulado, con el fin de obtener un complejo que reúna las características necesarias de conformación o también de fuerzas intermoleculares.

Complementario a este proceso de auto-ensamblaje, se debe poner atención a la agitación a la que se somete el proceso de formación de SUPRAS, pues es uno de los pasos determinantes para obtener un proceso de auto-ensamblaje de alto rendimiento [19].

1.1.3 Extracciones con agregados moleculares

Como alternativa a las conocidas extracciones líquido-líquido, se promueve el uso de agregados moleculares como un tipo de extracción cuantitativa. Sin embargo, no todos los agregados moleculares son adecuados para la interacción con un determinado analito, pues dependerá de su estructura y del medio en que se encuentre para que se lleve a cabo exitosamente la extracción.

De acuerdo a la necesidad de extracción se tienen como agregados moleculares: micelas, micelas inversas y vesículas, aunque también pueden haber agregados moleculares de tipo hemimicelares y admicelares, sin embargo estos últimos tienen aplicaciones bastante específicas [20].

- **Micelas**

Son agregados formados por la asociación espontánea de moléculas anfipáticas, con el fin de reducir la superficie de contacto de las regiones hidrofóbicas con el solvente acuoso. Las colas hidrofóbicas quedan inmersas en el interior, mientras que las cabezas hidrofílicas se exponen en la superficie. La conformación micelar que se lleva a cabo permite la solvatación de los grupos de las cadenas polares, y restringe la interacción entre el agua y la zona hidrofóbica de la micela [21]. El tamaño y forma de la micela depende de las propiedades de las cadenas hidrocarbonadas, de esta forma, las micelas pueden ser esféricas, elipsoidales, o similares a un disco plano, aunque la forma más común es la esférica con tamaños de 3 a 60 Å [22].

Existe el caso en que el proceso de formación de micelas se lleve a cabo con una cantidad reducida de moléculas anfífilas en la disolución acuosa, por lo tanto las colas hidrófobas no pueden ser protegidas del todo por las cabezas hidrofílicas y no se da la formación de micelas.

- **Micelas inversas**

Las micelas inversas son autoensamblados de moléculas anfífilas (surfactantes) de características particulares que permiten su formación una vez que son disueltas en solventes no polares. Su estructura se caracteriza por tener orientados los segmentos hidrofílicos hacia el centro micelar y los hidrofóbicos hacia la solución orgánica no polar. El tamaño de las entidades que se forman es de 40 a 80 Å [23].

- **Vesículas**

El tamaño de las vesículas es considerablemente mayor (300-5000 Å), y como consecuencia, el número de moléculas de soluto que pueden solubilizarse en las mismas es superior al que se solubilizan en las micelas [18].

1.1.4 Surfactante o Tensoactivo

Es una especie química que presenta una estructura polar y otra apolar. La estructura molecular que poseen estos compuestos anfífilos les confiere dos importantes

propiedades que los diferencian del resto de las sustancias químicas; su capacidad para adsorberse en las interfases (gas-líquido, líquido-líquido y sólido-líquido), dando lugar a la formación de monocapas; y formar agregados supramoleculares (micelas, bicapas, vesículas, etc.) de dimensiones coloidales y estructura bien definida tanto en disolución acuosa como en medios apolares [24].

Químicamente, una especie surfactante posee un extremo hidrófilo y otro hidrófobo. El primero, ejerce un efecto solubilizante y tiende a llevar a la molécula a disolución completa. El segundo en cambio evita la solubilidad de la molécula o contrarresta la tendencia del otro [25]. Gracias a la presencia de estos dos grupos en la estructura R-X, siendo R una cadena hidrocarbonada de 8 a 18 átomos de carbono denominada cola, de carácter hidrofóbico, y X un grupo polar, de naturaleza iónica o no iónica, denominado cabeza; es que se alcanza un equilibrio. Éste equilibrio permite que la molécula no se quede sin disolver ni que se disuelva completamente, más bien, que se coloque en la interfase de la fase orgánica e inorgánica, de manera que los grupos hidrófilos se orienten hacia la fase acuosa y los hidrófobos hacia la no acuosa.

Existen diferentes tipos de surfactantes útiles para la formación de los solventes supramoleculares, los cuales se enmarcan dentro de los siguientes grupos.

- **Surfactante iónico**

Es aquel que posee una gran afinidad con el agua, y gracias a la atracción electrostática hacia los dipolos del agua es capaz de arrastrar consigo a cadenas hidrocarbonadas [25]. Dentro de este se encuentran los surfactantes aniónico y catiónico.

- **Surfactante aniónico**

Se refiere a aquel surfactante que posee uno o varios grupos funcionales y que en presencia de una disolución acuosa llega a disociarse. Como resultado de la disociación se tienen: iones orgánicos cargados (grupo hidrófobo) negativamente que dan lugar a la tensoactividad, e iones positivos sencillos que le confieren la propiedad de solubilidad al compuesto [26]. De acuerdo a su estructura, los tensoactivos aniónicos se disponen a manera de una cadena alquílica lineal o ramificada que va de 10 a 14 carbonos, y en su extremo polar se ubica un anión.

- **Surfactante catiónico**

Es aquel que en presencia de una disolución acuosa tiene la capacidad de formar iones positivos (grupo hidrófobo). Generalmente son compuestos cuaternarios de amonio o una amina grasa en medio ácido. Son detergentes pobres [27].

- **Surfactante anfótero**

Son sustancias que presentan un grupo aniónico (carga negativa) y otro catiónico (carga positiva), por lo tanto, el carácter de la molécula será aniónico si se varía a un pH alcalino, pero si el pH se vuelve ácido la molécula tomará un carácter catiónico. Cuando el pH del medio permite el mismo nivel de ionización de los dos grupos se tiene el punto isoeléctrico, por lo que las moléculas serán denominadas “zwitterions” en este intervalo isoeléctrico [28]. En su estructura el radical R deberá ser una cadena alquílica lineal saturada con 12 a 18 carbonos.

- **Surfactante no iónico**

Son sustancias en las que la parte la hidrofílica corresponde a una cadena de polioxietileno, y por tanto, son solubles en soluciones acuosas debido a la existencia de los grupos hidroxilos en la molécula [26].

A continuación en la Figura 1.1, se resume los surfactantes comúnmente usados para la formación de SUPRAS.

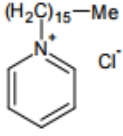
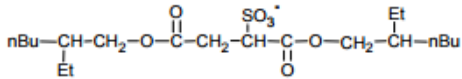
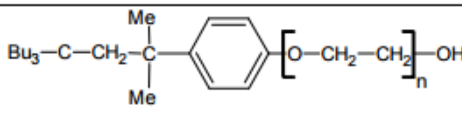
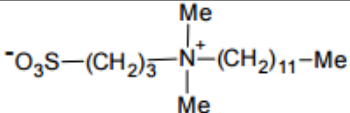
CATIONICOS	Bromuro de cetiltrimetil amonio (Br CTA)	$\text{Me}_3\text{—N}^+(\text{CH}_2)_{15}\text{—Me}$ Br^-
	Bromuro de dodeciltimetil amonio (Br DTA)	$\text{Me}_3\text{—N}^+(\text{CH}_2)_{11}\text{—Me}$ Br^-
	Cloruro de cetilpiridinio (CPC)	 Cl^-
ANIONICOS	Dodecil sulfato sódico (SDS)	$\text{Me—(CH}_2)_{11}\text{—SO}_3^-$ Na^+
	Bis (2-etilhexil)sulfosuccinato sódico (Aerosol OT)	
NO IONICOS	Polietilén glicol tert-octil fenil eter (Triton X-114)	
	Ácido decanoico	$\text{CO}_2\text{H—(CH}_2)_8\text{—Me}$
ANFÓTEROS	3-(dodecildimetilamonio) propano-1-sulfonato (SB-12)	

Figura 1.1. Clasificación de Surfactantes para el uso de extracciones con SUPRAS [29].

1.1.5 Solventes Supramoleculares

Denominados también SUPRAS, son líquidos nano-estructurados formados a partir de una disolución de moléculas anfifílicas mediante un proceso secuencial de autoensamblaje que implica las siguientes etapas.

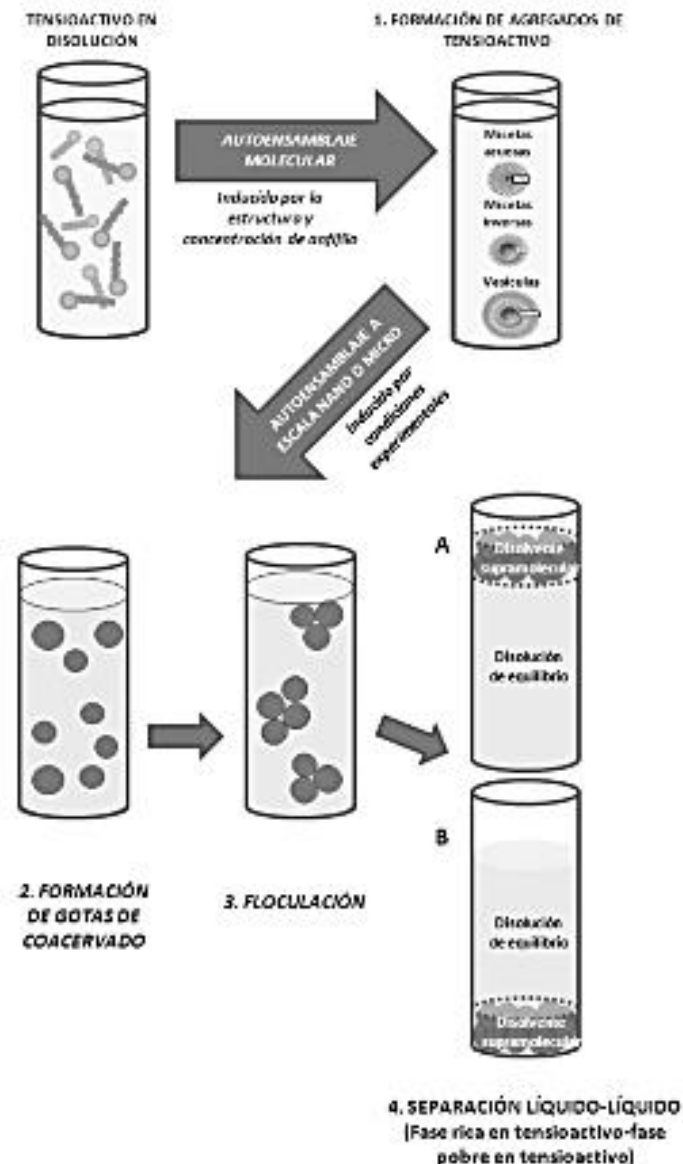


Figura 1.2 Proceso de autoensamblaje en la formación de solventes supramoleculares [4].

- Formación de agregados tridimensionales (micelas acuosas, inversas o vesículas) a partir de una disolución madre de tensioactivo.
- Agregación de los mismos y formación de una nueva fase líquida mediante un fenómeno definido por la IUPAC como coacervación dando lugar a “gotas de coacervado”.
- Floculación de las gotas dando lugar a clústeres de mayor tamaño.

- Separación de estas gotas dando lugar al disolvente supramolecular.

Los SUPRASs están constituidos por elevadas concentraciones de tensioactivo y son inmiscibles en el disolvente (normalmente agua) a partir del cual se generan, a pesar de que este disolvente sea un componente mayoritario del mismo y constituya la fase continua en la que los agregados se dispersan [3]. La disolución que queda en equilibrio con el disolvente supramolecular contiene los monómeros de tensioactivo. En este caso, la desolvatación de los grupos polares, con el consiguiente incremento en el tamaño de los agregados, se favorece por la interacción disolvente-disolvente que compite con la interacción disolvente-grupos polares. Un ejemplo de separación de fases causada mediante este mecanismo es la que se origina en micelas inversas de ácidos carboxílicos en tetrahidrofurano, promovida por la adición de agua, como se tiene en el presente estudio.

Los disolventes supramoleculares presentan una serie de propiedades adecuadas para ser usados como alternativa a los disolventes orgánicos convencionales en extracciones analíticas. Entre estas propiedades destacan las siguientes: la simplicidad de los procesos de autoensamblaje utilizados para su síntesis, la ubicuidad de los compuestos anfífilos en la naturaleza y la industria, posibilitando así la selección del tensioactivo más adecuado para cada aplicación, la elevada eficacia de solvatación para distintos compuestos orgánicos e inorgánicos gracias a la presencia de regiones de diferente polaridad dentro de los agregados y la capacidad multiligando de los agregados gracias a los múltiples grupos funcionales existentes en los mismos, lo que amplifica la capacidad de extracción [5].

Existen numerosos parámetros que determinan la solubilización de solutos (analitos) en los sistemas supramoleculares. A pesar de que existen innumerables posibles extracciones con SUPRAS, en razón de la estructura química que presentan, es imprescindible enfocarnos en el uso de los solventes supramoleculares del presente estudio. Cuando un sistema supramolecular se ve formado por ácidos carboxílicos o alcoholes, estaremos hablando de la formación de micelas inversas. El disolvente supramolecular sintetizado a partir de micelas inversas se pone en suspensión en un sistema de dos fases líquidas constituidas por el coacervado y la disolución en equilibrio con el mismo como se tiene en la Figura 1.2.

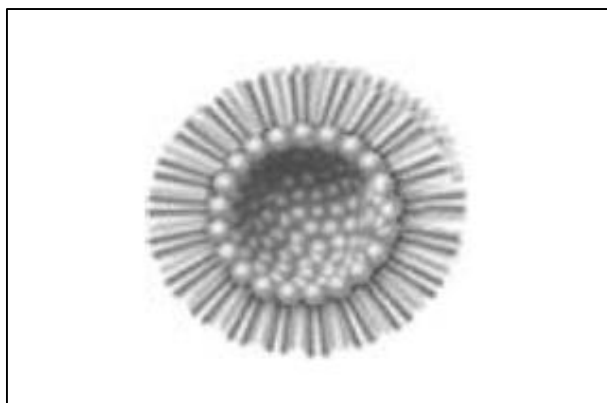


Figura 1.3 Representación simplificada de un agregado molecular de tipo micela inversa [5].

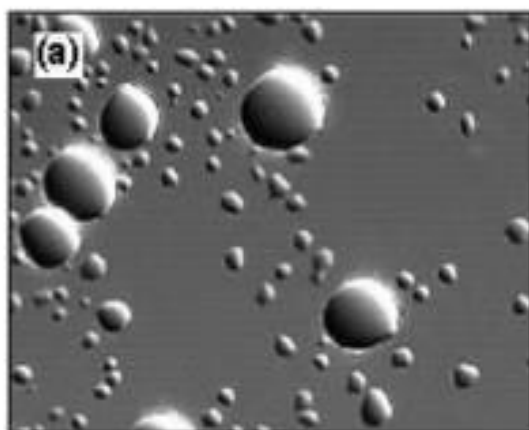


Figura 1.4 Coacervado formado por ácido decanoico y THF. Estructura globular [5].

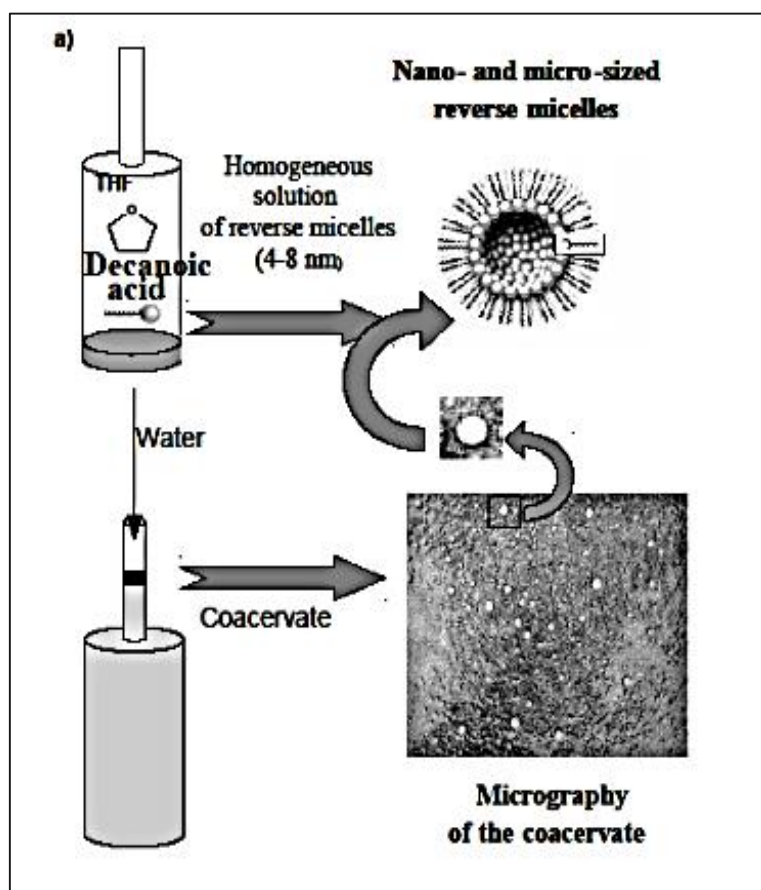


Figura 1.5 Ilustración del proceso autoensamblaje durante la formación del solvente supramolecular (microscopía de luz -campo claro) [5].

Tabla 1.1. Tipos de Solventes Supramoleculares [18].

Solvente Supramolecular	Surfactante
Micelas No Iónicas	Alcoholes Etoxilados (AE) C12E5 C12E6 C12E8 C10E6 C16E6 Tergitol 15-S-7 Alquil-fenil Etoxilados (APE) Tritón X-114
Micelas Zwitteriónicas	3-[decil-dimetilamonio]-propil sulfato
Micelas Aniónicas	Dodecilsulfato de sodio Dodecanosulfonato de sodio
Micelas Catiónicas	Cetrimida
Micelas Inversas de Ácidos Alquilcarboxílicos	Ácido decanoico
Vesícula de Ácidos Alquilcarboxílicos	Ácido octanoico Ácido decanoico Ácido dodecanoico Ácido tetradecanoico

En la presente disertación se ha llevado acabo la extracción utilizando micelas inversas de ácidos carboxílicos (ácido decanoico) y además se ha implementado el uso de alcoholes (n-octanol), por tanto, será necesario describir brevemente las propiedades de estos tipos de compuestos.

1.1.5.1 Propiedades de los Ácidos Carboxílicos

Son aquellos compuestos que poseen grupos hidrocarburo unidos a un grupo carboxílico. Un grupo carboxilo, es un grupo funcional que consiste en un átomo de carbono que por un lado tiene un doble enlace con el oxígeno, y por el otro, un enlace simple al grupo hidroxilo [30]. Una de las propiedades que desempeña un papel importante en los ácidos es la polaridad, propiedad que viene dada por la presencia del

grupo carboxilo en su estructura y que le confiere la característica de formar puentes de hidrógeno con el agua. El grupo carboxilo forma puentes de hidrógeno más estables que el de los alcoholes, debido a la mayor labilidad del hidrógeno a causa de la vecindad del grupo C=O [31]. Sin embargo, la solubilidad disminuirá a medida que aumente el número de carbonos en la cadena, de esta manera, a partir del ácido dodecanoico son ácidos insolubles en agua.

La reacción de un ácido carboxílico se debe al grupo carboxilo, es decir al carbonilo (C=O) y al hidroxilo (OH), éste último es el que da paso a casi todas las reacciones como la pérdida de un H^+ así como la sustitución del OH por otro grupo. El ácido utilizado en la presente disertación es el ácido decanoico. Éste ácido posee un aspecto de cristales incoloros y con un olor característico, por su número de carbonos igual a diez se considera un ácido insoluble en agua.

1.1.5.2 Propiedades de los Alcoholes

Los alcoholes son compuestos derivados de los hidrocarburos en donde uno o más hidrógenos de la “estructura base” se han sustituido por uno o más grupos hidroxilo (OH), y que se encuentran unidos a través de enlaces covalentes. De manera sintetizada se puede explicar la fórmula de un alcohol como ROH, siendo R un radical arilo o alquilo. Gracias a la presencia del grupo hidroxilo, los alcoholes son compuestos bastante polares. La relación de polaridad se ve influida por la relación de grupos hidroxilo y el número de átomos presentes en la cadena [32].

El n-octanol, alcohol de uso en la disertación, es un compuesto con 8 átomos de carbono y mono sustituido, es decir con solo un grupo hidroxilo. Es principalmente usado como solvente frente a los lípidos. Es un alcohol de apariencia oleosa e incolora. Como se conoce, la solubilidad de los alcoholes decrece conforme aumenta el número de carbonos, por tanto el octanol posee una cadena hidrocarbonada larga en relación a la presencia de un solo OH.

1.1.5.3 Estado del arte de los solventes supramoleculares como medios de extracción

El uso de solventes supramoleculares ha tenido gran acogida por parte de muchos investigadores que buscan obtener una excelente selectividad y cantidades de recuperación considerables para un determinado analito. A pesar de que no existe ningún estudio sobre la molécula de colesterol como analito en la extracción con solventes supramoleculares, es importante conocer la aplicabilidad de éste tipo de solventes en la extracción de diferentes analitos.

La extracción de compuestos como la bixina y norbixina (componentes principales del achiote) han sido sometidos a tratamientos son SUPRAS. Para esto se propuso un sistema ácido octanoico-THF-agua, cuyos porcentajes de recuperación estuvieron entre 78%-103% de bixina y norbixina respectivamente, mostrando gran afinidad que con los SUPRAS [33].

Otro estudio llevado a cabo es acerca de compuestos perfluorados. Siendo éstos compuestos anfifílicos, constituyen excelentes candidatos para interactuar con los SUPRAS a través de la formación de micelas inversas [34].

La aplicación en la determinación de residuos de ácido oxolínico y flumequina en pescado y mariscos, constituye una investigación se resalta una de las propiedades que ofrece el uso de solventes supramoleculares, correspondiente a la presencia de varias regiones con polaridades diferentes, lo que posibilita la formación de una variedad de interacciones entre el o los analitos con SUPRAS. De la misma manera, el SUPRAS formado fue mediante la formación de micelas en fase reversa, lo que permitió tener porcentajes de recuperación cercanos al 95% [35]

En función de las múltiples aplicaciones que ofrecen los solventes supramoleculares en la actualidad, se presentan la figura 1.5, 1.6 y 1.8, detallando los analitos que han sido extraídos utilizando SUPRAS.

Analito	Muestra	Tensioactivo (%)/ Condiciones de coacervación	Separación- detección/Factor de concentración teórico (FCT), recuperaciones (Rs, %) y límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)	
SUPRASs DE MICELAS ACUOSAS DE TENSIOACTIVOS NO IÓNICOS				
PAHs	Suelo	Tergitol 15-S-7/1% (v/v) 1.5M NH ₄ SO ₄	FIA-SUPRAS-CL-FL Rs: 88-105 LODs: 101-456 ng L ⁻¹	83
	Agua de mar	Polioxietilen-10-lauril éter (POLE)/ 1% (w/v) Temperatura (90°C)	CL-FL FCT: 17.6 Rs: 37.7-104 LODs: 1-150 ng L ⁻¹	84
Pesticidas	Frutas	Triton X-114/ 1.5 % (w/v) Temperatura (45°C) y NaCl (7%, w/v)	CL-UV Rs: 80-107 LODs: 0.1-1 ng g ⁻¹	85
	Orina humana	Triton X-114/ 0.14 % v/v Temperatura (50 °C) y NaCl (100 µL of saturated solution)	CG-FPD FCT: 50 Rs:85-107 LODs: 0.12-0.24 ng mL ⁻¹	86
	Arroz	Triton X-100/ 1% w/v Temperatura (50 °C) y NH ₄ SO ₄ (18% w/v)	CL-Vis Rs: 88-92 LOD: 0.5 ng g ⁻¹	87
Arbidol	Plasma de rata	Triton X-114/3.7 % w/v Temperatura (45°C)	CL-UV Rs: 89.7-92.7 LOQ: 0.08 µg mL ⁻¹	88
Venlafaxina	Plasma humano	Triton X-114/5 % w/v Temperatura (40°C) y NaCl (0.3 M)	CL-FL FCT: 1	89

Figura 1.6 Aplicación de solventes supramoleculares en varias matrices a través de micelas acuosas (surfactantes no iónicos) [5].

SUPRASs DE MICELAS ACUOSAS DE TENSIOACTIVOS IÓNICOS				
PAHs	Aguas naturales	Sodio de ácido dodecano sulfónico (SDSA)/0.1% w/v, 4 M HCl	CL-FL FCT: 140 Rs: 62-106 LODs: 0.1-7.9 ng L ⁻¹	79
	Suelo, sedimentos y lodos	Dodecano sulfonato sódico (SDoS)/ 2% w/v, 4 M HCl	CL-FL Rs:71-98 LODs: 101-456 ng L ⁻¹	96
Pesticidas	Agua potable, lago, cerveza y orina	Dodecano sulfonato sódico (SDoS)/ 0.9 % (w/v), 5.4M HCl	CL-UV FCTs: 6.9 Rs: 94-100 LOD: 4 µg L ⁻¹	97
	Agua potable, lago y nieve	Dodecil sulfato sódico (SDS)/ 2 % w/v, 5.4M HCl	Fluorimetría FCT: 3.7 Rs: 90.7-98.6 LODs: 1.90, 0.89 µg L ⁻¹	98
Tensioactivos	Lodo de	Dodecano sulfonato sódico (SDoS)/	LC-ESI(-)/EM(TI)	52

Figura 1.7. Aplicación de solventes supramoleculares en varias matrices a través de micelas acuosas (surfactantes iónicos) [5].

SUPRASs DE MICELAS INVERSAS				
Residuos veterinarios	Pescado y marisco	Micelas inversas de ácido decanoico in THF/H ₂ O/ 400 µL	CL-FL Rs: 99-102 LODs: 1.5–4.5 µg kg ⁻¹ , 2–6.6 µgkg ⁻¹	58
Sudan I, II, III y IV	Salsas con chile	Micelas inversas de ácido decanoico in THF/H ₂ O/ 0.5% (w/v) Water (36 mL, pH ~3)	CL-UV Rs: 86-108 LODs: 4.2, 2.7, 6.5 y 7.4 µg kg ⁻¹	104
Bisfenol A	Vegetales y frutas enlatados	Micelas inversas de ácido decanoico in THF/H ₂ O / 0.5% w/v 36 mL distilled water (1.3 mM HCl)	CL-FL Rs: 81-96 LODs: 1.3 ng g ⁻¹	105
	Orina Humana	Micelas inversas de ácido decanoico in THF/H ₂ O / 1% w/v Water content in diluted urine sample (~0.79 g mL ⁻¹ , pH ~3)	CL-FL FCT: ~42 Rs: 88-95 LOD: 197 ng L ⁻¹	106
Ocratoxina A	Vino	Micelas inversas de ácido decanoico in THF/H ₂ O / 0.5% w/v Water content in sample (~0.87 g mL ⁻¹ , pH ~3-3.5)	CL-FL FCT: 115 Rs: 85-100 LODs: 4.5 ng L ⁻¹ , 15 ng L ⁻¹	107

Figura 1.8. Aplicación de solventes supramoleculares en varias matrices a través de micelas inversas [5].

1.2 Cromatografía de gases

Al igual que el proceso de preparación de una muestra es un paso vital dentro del análisis, la selección del método cromatográfico para determinar un analito no evade la importancia, pues sin él resulta imposible continuar con la identificación del analito. Cuando se habla de cromatografía se puede hablar también de separación, identificación y determinación de analitos que se encuentran inmersos en una matriz, la misma que puede ser de origen complejo. La cromatografía es un proceso en el que los componentes a separar se distribuyen en dos fases: una móvil, que permite la disolución de la muestra, ésta puede ser un gas, un líquido o hasta un fluido supercrítico; y una

estacionaria que es inmisible y se encuentra fija en una columna o superficie sólida [36]. Para obtener una separación eficiente es necesario tomar en cuenta la afinidad que posee la muestra hacia las dos fases, pues esto permite que los analitos vayan quedando retenidos ordenadamente a la fase estacionaria, de tal manera que, aquellos compuestos que son retenidos con fuerza en la fase estacionaria fluyen con lentitud por la fase móvil, y lo opuesto sucede con los que no presentan demasiada afinidad con la fase estacionaria, es decir que se movilizan con rapidez.

Dentro de la cromatografía, se encuentra aquella que tiene como fase móvil un gas, a la que se denomina Cromatografía. En esta técnica básicamente se inyecta una cantidad de muestra (misma que debe contener analitos volátiles) a un flujo de gas inerte (que puede ser helio o nitrógeno) a temperatura elevada, en seguida la corriente de gas con la muestra atraviesan una columna cromatográfica en donde empieza la separación de los componentes de la muestra en función de la volatilidad y su afinidad con la fase estacionaria [37].

1.2.1 Componentes de un equipo de cromatografía de gases

El equipo de cromatografía de gases contiene elementos que se encuentran conectados entre sí con el fin de cumplir algunos requerimientos, tal es el caso de proporcionar un flujo constante de gas transportador (fase móvil), permitir el ingreso de la muestra en forma de vapor en la corriente de fase móvil, proporcionar un espacio adecuado para contener la longitud apropiada de fase estacionaria, aportar con el mantenimiento de la columna a la temperatura apropiada (o la secuencia del programa de temperatura),

detectar los componentes de la muestra conforme eluyen de la columna, y proveer una señal legible proporcional en magnitud a la cantidad de cada componente. Es importante conocer que en este tipo de cromatografía la fase móvil no interactúa con el analito, pues su única función es transportar al analito a través de la columna [38].

A continuación en la figura 1.2, se presenta un diagrama de un cromatógrafo de gases.

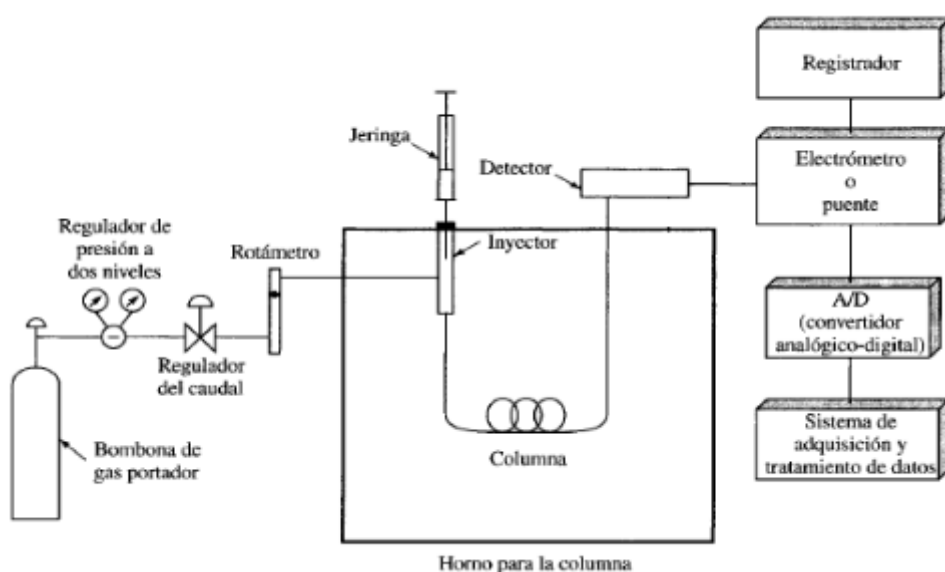


Figura 1.9. Diagrama de un cromatógrafo de gases [36].

➤ Gas portador

Usualmente en cromatografía de gases se utiliza como gas portador el helio, aunque dentro de la lista también se incluyen el argón, nitrógeno e hidrógeno. Es importante considerar que el gas portador debe ser capaz de suministrar una presión de gas adecuada y constante [36]. Es importante considerar que el gas elegido como gas portador debe ser químicamente inerte y no reaccionar ni con los analitos ni con la fase

estacionaria. Así mismo, hay que tomar en cuenta la pureza, pues de lo contrario se podría producir ruido en la línea base influyendo de manera negativa en la sensibilidad y en los límites de detección de la separación.

➤ **Sistema de inyección de muestra**

El sistema de inyección de muestra a través de una jeringa manual ha sido reemplazado por un sistema de inyección automatizado, permitiendo eficientemente la introducción de la muestra en la corriente del gas portador. De esta manera, el puerto de inyección constituye una cámara que se conecta con la parte inicial de la columna, y que se calienta de manera independiente a la columna [39]. Una vez vaporizada la muestra ingresa a la columna atravesando un septum resistente a temperaturas altas. La inyección lenta de muestras demasiado grandes provoca un ensanchamiento de las bandas y una pobre resolución. El uso de microjeringas para la inyección de muestras líquidas o gaseosas a través de un septum es el método más eficaz. De igual manera, es importante considerar las características de la jeringa y el volumen de inyección.

➤ **Horno y columna**

Dentro de cromatografía de gases se pueden utilizar dos tipos de columna: las empaquetadas y capilares, esto de acuerdo a la separación que se vaya llevar a cabo. Como la columna cromatográfica trabaja a temperaturas elevadas, es importante mantener un riguroso control de la misma, por lo que es necesario que la columna se

almacene en un espacio que pueda resistir las temperaturas establecidas, todo esto a través de lo que se conoce como un horno. La temperatura que puede alcanzar una columna depende de los puntos de ebullición de los componentes que se vayan a separar. Para muestras con un intervalo amplio de ebullición, es necesario crear una programación de temperatura, de tal manera que se vaya incrementando por etapas ciertas temperaturas al mismo tiempo que se van separando los compuestos [40].

➤ Sistema de detección

Los detectores que se utilizan en cromatografía de gases son de tipo diferencial, es decir que no solo indican una respuesta cuando pasa el gas portador, pues muestran una señal si existe algún componente en la columna que se está eluyendo, mismo que es conducido por el gas portador. De esta manera, la señal que se identifica como no medible es transformada a una señal eléctrica, ésta es amplificada y registrada al momento de salir de la columna [38].

Para la cuantificación de colesterol se utilizó un detector de ionización de llama. A este detector se lo conoce como “universal” pues bastante usado para diversos análisis, específicamente por su selectividad hacia los enlaces C-H. Su funcionamiento básicamente corresponde a la mezcla entre el gas que procede de la columna con hidrógeno y aire; de tal manera que, al circular un compuesto orgánico que ya haya eluído, éste se quemará, y como resultado de la combustión, se formarán iones conducidos por una llama con el fin de proveer una respuesta eléctrica [41].

1.3 Parámetros de optimización de un método analítico

1.3.1 Selectividad

La selectividad puede definirse como la capacidad de un método analítico para producir resultados que únicamente dependan del analito. Indica el grado de ausencia de interferencias debido a otras especies que pueden estar contenidas en la matriz. Es por eso que en un método se busca obtener el menor número de interferencias en la muestra a través de su tratamiento ya sea por métodos químicos como el uso de agentes enmascarantes, ajuste de pH, formación de complejos y otros; y también físicos como precipitación, destilación, volatilización y otros [42]. Este parámetro tiene relación con la exactitud ya que la presencia de interferencias causa errores sistemáticos.

1.3.2 Precisión

La precisión del método está relacionada con la disposición de las medidas alrededor de su valor medio o central, y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales, cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. La repetibilidad y reproducibilidad son medidas que se atribuyen a la precisión, siendo la primera la variabilidad manifestada cuando un método es aplicado por un solo analista, con el mismo equipo y con cortos tiempos de análisis; y la segunda, se refiere a la variabilidad que conlleva una muestra cuando es analizada por varios laboratorios [43].

1.3.3 Exactitud

La exactitud se define como la capacidad que posee un método para originar resultados próximos al valor esperado o teórico. Entonces, la exactitud se encarga de medir los errores sistemáticos existentes en un método. Cuando en un análisis se habla de exactitud se refiere a una combinación de veracidad y precisión [44]. La veracidad se refiere al grado de coincidencia entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado, y que puede ser determinado por dos métodos: sesgo o recuperación.

El sesgo mide la diferencia entre los resultados esperados de un ensayo y el valor verdadero. Su evaluación se puede llevar a cabo a través de la comparación con valores de referencia (material de referencia), material fortificado, o también con valores reportados por un método normalizado. Cuanto más pequeño es el sesgo, mayor veracidad indica el método. A esto se le añade el análisis de dos medias con t-student [44].

La recuperación se refiere a la cuantificación de una fracción de analito añadido a una muestra (muestra fortificada), y que recibe el mismo tratamiento que las demás muestras para su posterior análisis. La recuperación permite verificar la eficiencia de un método extracción en un análisis, así como la cantidad inicial de un analito en una muestra [45]. Es importante tomar en cuenta que este parámetro se relaciona directamente con las características que presente la matriz.

1.3.4 Efecto Matriz

El efecto matriz se refiere a la disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros compuestos en la muestra. En otras palabras, para la misma concentración de analito, el análisis de una muestra real o de una disolución estándar del analito puro no proporciona la misma respuesta instrumental y por lo tanto representa una fuente de error sistemático [45].

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Muestreo

El presente trabajo se enfoca en la evaluación del método de extracción con SUPRAS de colesterol en una matriz alimenticia como es el huevo. De esta manera, para llevar a cabo el muestreo se definió utilizar el muestreo aleatorio por conglomerados. En este tipo de muestreo la unidad muestral será un conjunto de elementos de una población que formen una unidad (conglomerado). Un conglomerado natural en este caso se refiere a las cajas de huevos existentes en supermercados y mercados.

En esta investigación, los supermercados seleccionados fueron “Supermaxi” y “Santa María”, lugares de mayor afluencia por la población quiteña, y como único mercado “Santa Clara”. Una vez que se llevó a cabo la selección aleatoria de los conglomerados (cajas de huevos), se procedió a tomar 5 elementos (huevos) de cada uno para formar una muestra a lo que se denominó “*pool*” (mezcla de clara y yema). Cada uno de los *pool* fue almacenado en recipientes plásticos y llevado a refrigeración. Las marcas comerciales que se adquirieron fueron: huevos Oro, huevos Bio, huevos del Campo (PRONACA), huevos Indaves (PRONACA), huevos Supermaxi, huevos Santa María, huevos Indaves con Omega 3 y Vitamina E (PRONACA), huevos Criollos A, huevos Criollos B y huevos Criollos C. Éstos últimos fueron adquiridos en tres diferentes puntos de venta dentro del mercado “Santa Clara”. Para facilidad en el reconocimiento

de cada una de las muestras se presenta a continuación la siguiente Tabla 2.1 con las codificaciones respectivas para cada una de ellas.

Tabla 2.1. Codificación de muestras de huevos de gallina utilizados en el estudio

Nombre Comercial	Código	Lugar de Origen
Huevos Supermaxi	SUPER	Supermercado “Supermaxi”
Huevos Bio	BIO	
Huevos del Campo	CAMP	
Huevos Indaves	IND	
Huevos Oro	ORO	Supermercado “Santa María”
Huevos Santa María	SM	
Huevos Indaves + Omega3+ Vitamina E	VE	
Huevos Criollos A	CA	Mercado “Santa Clara”
Huevos Criollos B	CB	
Huevos Criollos C	CC	

2.2. Desarrollo del método cromatográfico para la determinación de colesterol

El equipo que se utilizó para llevar a cabo la presente disertación fue GC (siglas en inglés) AGILENT Technologies (modelo 7890 A) equipado con un FID (siglas en inglés). Para el funcionamiento de este último se emplearon cilindros de Nitrógeno y Aire, grado 4.9 marca Linde y un generador de hidrógeno de marca Parker ChromGas (modelo Gas Generator 9090). Los detalles de la columna con la que se desarrolló la

optimización del método cromatográfico y los análisis de muestras en esta disertación se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Especificaciones de la columna que se utilizó para el análisis cromatográfico.

Parámetro	Características
Marca y modelo	Agilent HP-5
Fase estacionaria	5% Fenil-metil polisiloxano
Espesor de película	0,25 μm
Longitud	30,00 m
Diámetro interno	320 μm
Temperatura máxima	325 $^{\circ}\text{C}$

Una vez que se seleccionó la columna para trabajar en el análisis cromatográfico de colesterol, se llevó a cabo la optimización del método cromatográfico. Para esto se utilizó una solución de colesterol de 4000 mg/L en THF. Las variables que se evaluaron fueron: temperatura del inyector (250, 275 y 300 $^{\circ}\text{C}$), temperatura de la columna (100, 200 y 300 $^{\circ}\text{C}$ como programas isotérmicos, y un programa usando una rampa de temperaturas: 150 por 1 min/4 $^{\circ}\text{C}$, 250 por 1min/6 $^{\circ}\text{C}$, 300 por 5 min.), post-run (temperatura luego de la corrida: 0 y 315 $^{\circ}\text{C}$), y temperatura del detector (280, 300, 310 $^{\circ}\text{C}$). Para cada una de éstas variables se realizó una sola inyección por nivel y variable. En función de la simetría del pico, el tiempo total de análisis y la mayor área del pico de colesterol, se seleccionó el método cromatográfico.

2.3. Selección del SUPRAS para la extracción de colesterol

Dado que un solvente supramolecular resulta de la mezcla de un surfactante, un solvente y agua para generar un autoensamblaje perfecto con el analito de interés, los parámetros que se evaluaron fueron: tipo de surfactante, proporción de THF/H₂O y concentración de surfactante como se muestra en la tabla 2.3. Los surfactantes con los que se trabajaron para la selección del SUPRAS para la extracción de colesterol fueron ácido decanoico y n-octanol, surfactantes disponibles en la Escuela de Ciencias Químicas.

Tabla 2.3. Variables y niveles evaluados para la selección del solvente supramolecular.

Tipo de Surfactante									
Ácido decanoico				n-Octanol					
Proporción THF/H ₂ O (v/v) mL									
40/60		60/40		70/30		30/70		50/50	
9/13,5		13,5/9		15,75/6,75		6,75/15,75		11,25/11,25	
Concentración de surfactante*									
2%		4%		6%		8%			
0,45 g	550 µL	0,90 g	1100 µL	1,35 g	1630 µL	1,90 g	2180 µL		

*Los cuadros con coloración naranja son los gramos de ácido decanoico, y los cuadros de coloración verde son los microlitros de n-octanol, correspondientes a ese porcentaje.

El procedimiento para la selección del SUPRAS comenzó con la elección de la muestra, en este caso, se llevó a cabo con un *pool* de 5 huevos de gallina de una marca X adquirida al azar. No se realizó cuantificación, sino que se evaluó directamente el área de los picos obtenidos. Se optó por éste mismo criterio para la optimización de las secciones que se describen más adelante (2.3.1, 2.3.2, y 2.3.3). A continuación se

describen los materiales, equipos y reactivos utilizados; así como el procedimiento utilizado para la evaluación de la proporción THF/H₂O y concentración de surfactante.

➤ **Materiales**

- Tubos falcon de 13 y 25 cm³
- Vasos de precipitación
- Balones de aforo
- Espátula metálica
- Gradillas
- Agitador magnético
- Agitador de vidrio
- Imán cilíndrico para agitación magnética
- Pipetas automáticas
- Puntas para pipetas automáticas
- Soporte universal
- Pinzas
- Viales con tapa
- Campana o Sorbona
- Insertos de 100 µL para viales

➤ **Equipos**

- Vórtex Genie® 2 Cat. No. 3030A
- Centrífuga J.P.Selecta, Mixtasel

- Balanza Analítica Mettler Toledo AL204 (máx. 210g / mín. 0,01g)
- Campana de extracción LABCONCO
- Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama AGILENT Technologies (modelo 7890 A)
- Generador de hidrógeno Parker ChromGas (modelo Gas Generator 9090)

➤ **Reactivos**

- Ácido decanoico G.A.
- n-Octanol G.A.
- Tetrahidrofurano CHROMASOLV® Plus (HPLC, > 99,9%)
- Cloroformo G.A
- n-Hexano G.A
- Estándar de colesterol MERCK ($\geq 95,00$)

➤ **Procedimiento**

• **Obtención del solvente supramolecular**

1. Se tomó una porción de surfactante como se muestra en la Tabla 2.3 (concentración de surfactante), en un tubo falcon de 50 mL, limpio y seco.
2. Se añadió lentamente un volumen determinado de THF (Tabla 2.3 – proporción de THF/H₂O) al tubo falcon.
3. Se llevó el tubo a una agitación vigorosa por medio del vórtex por un lapso de 1 a 2 minutos.

4. Se retiró el tubo del vórtex y se completó la mezcla añadiendo un volumen determinado de agua destilada (Tabla 2.3 – proporción de THF/H₂O) de manera cuidadosa.
5. Se llevó la mezcla a centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos para permitir una separación eficiente del SUPRAS y del sobrenadante.
6. Se dejó reposar el tubo que contiene el SUPRAS por alrededor de 1 minuto o hasta observar la formación de las dos capas (fase orgánica SUPRAS e inorgánica).
7. Se extrajo la capa orgánica de la mezcla utilizando una pipeta de volumen variable, y se almacenó en un tubo por separado. Es importante que la última parte de la fase orgánica SUPRAS sea extraída cuidadosamente para evitar contacto con la fase inorgánica.
8. Se aseguró el cierre del tubo de tal manera que se evite la emanación de vapores orgánicos al ambiente. Esto se realizará utilizando papel parafilm.
9. Se almacenó el solvente bajo refrigeración (4°C).

- **Extracción de colesterol con SUPRAS**

1. Se pesaron 200 mg de muestra del *pool* realizado en un tubo falcon.
2. Se añadió un volumen determinado de SUPRAS (Tabla 2.4 – volúmenes de SUPRAS) respectivamente sobre la muestra.
3. Se agitó la muestra con la ayuda de un vórtex a 2500 rpm por el tiempo establecido (Tabla 2.4 – tiempos de agitación) respectivamente.
4. Se centrifugó la muestra a 4200 rpm por el tiempo establecido (Tabla 2.4 – tiempos de centrifugación) respectivamente.

5. Se observó la formación de dos fases. Se retiró el extracto supramolecular (primera fase) con la ayuda de una pipeta de volumen variable de 200 μL .
6. Se transfirió la mayor cantidad del extracto obtenido a un vial que contenía un inserto (para ayudar a que la jeringa del cromatógrafo tome la cantidad de muestra necesaria).
7. Se llevó a cabo la lectura por GC-FID de cada uno de los extractos supramoleculares por triplicado.

2.3.1. Evaluación de la proporción THF/H₂O

Para la evaluación de la proporción de THF/H₂O, se decidió probar con dos surfactantes n-octanol y ácido decanoico; y como se menciona en la Tabla 2.3, las proporciones de THF/H₂O evaluadas por igual para los dos surfactantes fueron: 40/60, 60/40, 30/70, 70/30 y 50/50. Los pasos que se llevaron a cabo esta evaluación son los descritos en esta sección 2.3, en el apartado correspondiente a procedimiento. Adicionalmente se realizó una dilución 900THF/100 extracto supramolecular para realizar las lecturas en el cromatógrafo de gases.

Una vez que se obtuvieron las lecturas de las muestras y los cromatogramas, se obtuvieron los promedios y desviaciones estándar de las áreas del pico de colesterol obtenidas en cada caso, y se seleccionaron aquellas que presentaron una mayor área y/o menor desviación estándar. Con éstos resultados se continuó con el análisis del siguiente parámetro correspondiente a concentración de surfactante.

2.3.2. Evaluación de la concentración de surfactante.

Para la evaluación de éste parámetro se cubrieron las concentraciones de 2, 4, 6 y 8% para cada surfactante respectivamente (n-octanol y ácido decanoico) como se especifica en la Tabla 2.3. El procedimiento realizado es el mismo que se llevó a cabo para la evaluación de la proporción de THF/H₂O (sección 2.3, procedimiento). Adicionalmente se realizó la dilución 900/100 mencionada anteriormente para realizar las lecturas en el cromatógrafo de gases.

Con los valores resultantes de las áreas del pico de colesterol de las proporciones de 2 a 8%, se obtuvieron los promedios y desviaciones estándar, y fueron seleccionados como óptimos aquellos con mayores áreas y por lo tanto, con mayores niveles de colesterol en el extracto. A continuación, se realizó un análisis de comparación de varianzas ANOVA. Una vez que se concluyó el análisis estadístico, se seleccionaron las condiciones más adecuadas que condujeron a la obtención del solvente supramolecular óptimo para la extracción de colesterol.

2.4. Optimización del método de extracción con SUPRAS

Una vez que se obtuvo el solvente supramolecular óptimo para llevar a cabo la extracción de colesterol, se procedió con la optimización de los parámetros que pueden influir en ésta: volumen de SUPRAS, tiempo de agitación y tiempo de centrifugado, tal y como se especifica en la Tabla 2.4. Para cada uno de los parámetros evaluados en este

acápíte se siguió el procedimiento usado en la sección 2.3, junto con la dilución 900/100 para su posterior lectura en el cromatógrafo de gases.

Tabla 2.4. Variables y niveles evaluados para la extracción de colesterol con SUPRAS.

Volumen de SUPRAS				
200 µL	400 µL	600 µL	800 µL	1000 µL
Tiempo de agitación				
5 min.	8 min.	10 min.	15 min.	
Tiempo de centrifugado				
10 min.	12 min.	15 min.	20 min.	

- **Volumen de solvente supramolecular**

Para este parámetro se consideraron volúmenes de solvente supramolecular en un rango de 200 a 1000 µL, medidos con una pipeta de volumen variable BOECO-Germany, y con el procedimiento de la sección 2.3 (tomando en cuenta los niveles descritos en la Tabla 2.4 para volumen de SUPRAS). Adicionalmente, la dilución 900/100 para su posterior lectura en el cromatógrafo de gases.

Con los resultados obtenidos por análisis cromatográfico, se determinaron promedios y desviaciones estándar de las áreas correspondientes al pico del colesterol. El análisis estadístico realizado fue el análisis de varianzas o ANOVA. De acuerdo al volumen que presentó una mayor área del pico de colesterol, y considerando el análisis estadístico, se

determinó el volumen óptimo de solvente supramolecular para la extracción de colesterol.

- **Tiempo de agitación**

El rango establecido para el tiempo de agitación fue de 5 a 15 minutos. Se empleó un vórtex DAIGGER Genie 2. El procedimiento (tomando en cuenta los niveles descritos para tiempo de agitación en la Tabla 2.4), la dilución, y el criterio en la elección del tiempo de agitación óptimo, fueron los mismos que se emplearon en el parámetro volumen de SUPRAS.

- **Tiempo de centrifugado**

El rango establecido para el tiempo de centrifugado fue de 10 a 20 minutos, sin control de temperatura, a 4000 rpm en el equipo SELECTA P MIXTASEL. El procedimiento (tomando en cuenta los niveles descritos para tiempo de centrifugado en la Tabla 2.4), la dilución, y el criterio en la elección del tiempo de centrifugación óptimo, fueron los mismos que se emplearon en el parámetro volumen de SUPRAS.

2.5. Evaluación del desempeño del método

2.5.1. Selectividad

Una vez concluida la selección del SUPRAS y la optimización del método de extracción, se llevó a cabo la selectividad del método de extracción realizando la lectura de tres testigos: un blanco, un estándar y una muestra tomada al azar. Para el primer testigo se seleccionó como muestra agua destilada. Sobre ésta se llevó a cabo el procedimiento descrito en el acápite 2.3, junto con materiales, equipos y reactivos propuestos en el mismo. Con respecto al segundo testigo, se preparó una solución de estándar de colesterol de 4000 mg/L. Finalmente, para el tercer testigo, se seleccionó una muestra X de huevos de gallina adquirida en un supermercado. De esta muestra se realizó un *pool* de 5 huevos, y se aplicó el procedimiento propuesto en el acápite 2.3. Una vez realizadas las lecturas en el cromatógrafo de gases, se observó la presencia o ausencia, de variaciones o interferencias, entre los cromatogramas de los testigos.

2.5.2. Exactitud

Dado que la exactitud puede expresarse en términos de veracidad, y ésta a su vez como sesgo y recuperación, se llevaron a cabo una serie de análisis que permitieron obtener la información necesaria para determinar eficazmente la exactitud del método.

Para la recuperación se trabajó con muestras fortificadas, para las cuales se seleccionaron como matrices: clara de huevo y aceite de soya, este último libre de colesterol. Sobre cada una de estas matrices se realizaron fortificaciones con 500 µL de soluciones de: 40000 mg/L, 16000 mg/L, 10000 mg/L, 8000 mg/L y 4000 mg/L colesterol en THF. Cada muestra fortificada se realizó por triplicado, y siguiendo el procedimiento descrito en el acápite 2.3 para la obtención del SUPRAS y la extracción

de colesterol. A través de los resultados obtenidos por cromatografía de gases, se determinó la recuperación del analito en cada muestra aplicando la siguiente ecuación:

$$R = \frac{C_e - C_o}{C_a} \cdot 100 \quad (1.1)$$

Donde:

R la recuperación, C_e la concentración de analito de la muestra enriquecida, C_o la concentración de analito medida en la muestra sin fortificar, y C_a la concentración de analito adicionado a la muestra enriquecida.

Para la evaluación del sesgo es necesario tener dos valores: uno de referencia y otro obtenido convencionalmente en el laboratorio. Para la obtención del valor de referencia de las muestras de huevo de gallina, se recurrió a un análisis de colesterol realizado por un laboratorio acreditado (SEIDLA). Esto en función de la inexistencia de este dato bibliográfico acerca del contenido de colesterol en huevos ecuatorianos. El valor convencional requerido para la evaluación del sesgo, se realizó en el laboratorio de la PUCE, tomando una muestra de huevos de gallina de una marca X y realizando un *pool* de 5 huevos. El procedimiento llevado a cabo es el propuesto en el acápite 2.3. Una vez obtenidos los resultados en el cromatógrafo de gases, se realizó el cálculo matemático y estadístico para de tal manera obtener la exactitud del método utilizando las siguientes ecuaciones:

$$s = X - X_a \quad (1.2)$$

Donde:

S : sesgo

X : lectura obtenida o valor promedio de las lecturas obtenidas.

X_a : valor asignado, valor certificado del material de referencia o valor esperado.

Para evaluar el sesgo, se realiza la prueba t , en la cual el t calculado deber ser menor que el t tabulado:

$$t_{calc.} < t_{tab.}$$

$$t_{calc.} = \frac{(X_a - X)}{SD.(\sqrt{n})}$$

(1.3)

Donde:

$t_{calc.}$: t observado o calculado.

X_a : valor esperado o valor certificado en concentración.

X : promedio de valores leídos u observados en concentración.

SD : desviación estándar.

n : número de lecturas o valores observados.

2.5.3. Precisión

Éste parámetro se evaluó a través de la prueba F-Fisher, misma que evalúa los errores aleatorios presentes en el método como una medida de precisión. De manera similar que para el parámetro exactitud, se utilizaron los datos obtenidos por el laboratorio SEIDLA, como datos de referencia, y el valor convencional requerido para la

evaluación de la precisión, se realizó en el laboratorio de la PUCE, tomando una muestra de huevos de gallina de una marca X y realizando un *pool* de 5 huevos. La obtención y preparación de la muestra fue de manera similar que en el apartado 2.5.2. Con los resultados arrojados por el cromatógrafo de gases, y gracias al estadístico F-Fisher, se realizó una comparación de varianzas. Es importante considerar que, si se cumple la hipótesis nula “no existe diferencia significativa”, se sigue con el análisis del estadístico t-student para varianzas desiguales, y de esta manera determinar la precisión del método.

$$F_{calc.} = \frac{\sigma_1}{\sigma_2} \quad (1.4)$$

Donde:

σ_1 = varianza mayor

σ_2 = varianza menor

2.5.4. Efecto Matriz

Para su evaluación se construyeron curvas de calibración utilizando como blancos de muestra: clara de huevo y aceite de soya. A éstas muestras se realizaron fortificaciones, y fueron sometidas al mismo tratamiento que las muestras regulares (sección 2.3), previo su análisis cromatográfico. Las concentraciones y volúmenes de fortificación ensayados se especifican a continuación.

2.5.4.1. Primera fortificación

- Se construyeron dos curvas de calibración, la primera usando clara de huevo (pool de 100 g) y la restante usando aceite de soya.
- Se tomaron 9 muestras de cada matriz con un peso de 5 g.
- A cada una se fortificó con volúmenes de: 25, 50, 75, 100, 125, 250, 375, 500 y 625 μL de una solución de 40000 mg/L de colesterol en THF.
- Se tomaron los 200 mg de cada muestra fortificada, requeridos para la extracción con SUPRAS y siguiendo el procedimiento descrito en el acápite 2.3.
- Se trabajó por triplicado para cada muestra y con dilución 900 THF /100 μL extracto supramolecular, para su posterior análisis cromatográfico.

2.5.4.2. Segunda fortificación

- Se tomaron 3 muestra de aceite cada una con un peso de 5 gramos.
- A cada una de éstas se les agregó 500 μL de las soluciones 40000, 16000 y 10000 mg/L de colesterol en THF.
- Se tomaron los 200 mg de cada muestra fortificada requeridos para la extracción con SUPRAS, y siguiendo el procedimiento descrito en el acápite 2.3, para el posterior análisis cromatográfico.
- Cada muestra se trabajó por duplicado y sin dilución.

2.5.4.3. Tercera fortificación

- Se pesaron 4 muestras de aceite cada una con un peso de 200 mg.

- Se realizó una fortificación directa a cada una de éstas, es decir que se les añadió respectivamente: 25, 50, 100 y 250 μL de la solución de 40000 mg/L de colesterol en THF.
- Se realizó la extracción con SUPRAS de cada muestra (siguiendo el procedimiento descrito en el acápite 2.3), para su posterior análisis cromatográfico.
- Se trabajó por duplicado y sin dilución.

2.6. Análisis de muestras de huevos de gallina

Una vez que se llevó a cabo el muestreo de huevos de gallina en los lugares seleccionados, y después de realizar un *pool* (5 huevos de gallina) de cada una de las muestras adquiridas, se procedió a su extracción (de acuerdo al procedimiento expuesto en el acápite 2.3), con el método optimizado, y posterior determinación de colesterol por cromatografía de gases con detector de ionización de llama.

2.6.1. Cuantificación de colesterol por cromatografía de gases

Una vez obtenidos los cromatogramas, se determinó el área del pico del colesterol y su posterior cuantificación a través de la ecuación de la recta de la curva de calibración. Esta curva fue obtenida a partir de cinco estándares de colesterol en THF de concentración conocida: 800 mg/L, 1300 mg/L, 1800 mg/L, 2300 mg/L y 2800 mg/L, obtenidos a partir de una solución stock de 4000 mg/L preparada con el estándar de colesterol. La ecuación de la recta queda expresada de la siguiente manera:

$$y = mx + b \quad (1.7)$$

En la cual, y representa la respuesta del detector expresada en el área del pico del colesterol, m será la pendiente de la recta, x corresponde a la concentración de colesterol en el extracto supramolecular y b será el intercepto de la recta cuando la concentración es cero.

Los resultados de concentración que se obtienen a partir de la curva de calibración (x) corresponden a la concentración de colesterol en el extracto supramolecular después de haber sido extraído con 400 μL de SUPRAS, sin embargo, los resultados deben presentarse en función de 100 g de huevo de gallina, por esta razón se presentan a continuación las siguientes ecuaciones.

$$x_1 = \frac{\text{Concentración interpolada} \cdot \text{Volumen SUPRAS}}{1000000 \mu\text{L}}$$

$$1\text{L} = 1000000 \mu\text{L}$$

(1.8)

Donde:

x_1 : concentración de colesterol en miligramos en 1 litro de SUPRAS.

Concentración interpolada: valor de la concentración de colesterol ubicado en las abscisas de la curva de calibración.

Volumen de SUPRAS: volumen de solvente supramolecular usado para la extracción.

$$x_2 = \frac{x_1 \cdot 100000 \text{ mg}}{\text{Peso muestra inicial}}$$

$$100g \text{ muestra} = 100000 \text{ mg}$$

(1.9)

Donde:

x_2 : concentración de colesterol en miligramos por cada 100 gramos de huevo.

Peso muestra inicial: peso de la muestra de huevo a extraer en miligramos.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Optimización del método cromatográfico

Como resultado de las lecturas de los extractos supramoleculares por GC-FID, se obtuvieron las mayores áreas del pico del colesterol utilizando las condiciones cromatográficas que se especifican en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Optimización del método cromatográfico para la determinación de colesterol en huevos de gallina.

Inyector	Tipo	Automático
	Volumen de inyección	1 µL
	Nº lavados de jeringa con solvente	3 (Pre-Iny) 5 (Post-Iny)
	Nº lavados de jeringa con muestra	1 (4 µL)
	Nº bombeos de jeringa en la muestra	3
Cámara de Inyección	Temperatura	300 °C
	Presión	20,074 psi
	Flujo Total	45,874 mL/min
	Flujo de Purga de Septum	3 mL/min
	Modo	Split
	Razón de Split	20:1

	Flujo de Split	40,832 mL/min
Condiciones de Columna	Flujo	2,0416 mL/min
	Presión	20,074 psi
	Velocidad Lineal Promedio	45,95 cm/seg
	Gas Portador	Helio
Condiciones del horno de la Columna	Tiempo de Equilibrio	3 min
	Temperatura Inicial	300 °C
	Post Run	315 °C / 6 min
Condiciones del Detector	Temperatura	310 °C
	Flujo de Aire	400 mL/min
	Flujo de Hidrógeno	40 mL/min
	Flujo de Gas Make up (N ₂)	15 mL/min

Un hecho relevante en la optimización del método cromatográfico fue la diferencia en la utilización de temperatura programada y temperatura isotérmica. La primera, permitió tener visible el pico de colesterol a los 22 minutos aproximadamente, siendo éste un pico con un área menor a la obtenida con el segundo método, con un tiempo de corrida de 5 minutos y con el pico de colesterol visible a los 4 minutos. Las variables restantes evaluadas: temperatura de inyección y temperatura de detector, no incidieron de manera significativa en la optimización del método cromatográfico, pues los resultados del área del pico de colesterol no presentaron variaciones al trabajar con cada nivel y variable. La programación de temperatura como post-run (temperatura luego de la corrida), fue una variable imprescindible para la obtención de cromatogramas “limpios”, es decir, que no presenten interferencias superpuestas en los cromatogramas de muestras futuras.

3.2. Selección del SUPRAS para la extracción de colesterol

Los tipos de surfactantes: ácido decanoico y n-octanol, así como las variaciones en la proporción THF/H₂O fueron evaluadas para la obtención de un SUPRAS óptimo. La obtención de los extractos supramoleculares se trabajó bajo dilución (factor de dilución de 10). Éste procedimiento no afecta en la optimización del surfactante y proporción THF/H₂O, puesto que únicamente se desea observar las mayores áreas obtenidas. Además, esto fue sugerido puesto que, como el colesterol es un componente mayoritario en el huevo, se quería evitar daños a la columna cromatográfica por saturación de la fase estacionaria.

Para facilitar el proceso de formación del solvente supramolecular con los surfactantes de carácter no iónico, se decidió trabajar con una mezcla de dos solventes (THF y H₂O). La condición que se debe cumplir para la formación del SUPRAS, es que los agregados (unión de moléculas de surfactante), posean diferente solubilidad respecto a cada uno de los solventes seleccionados. Esta condición da lugar a dos tipo de interacciones: solvente-solvente y solvente-grupos polares; y por consiguiente, habrá un aumento de tamaño por parte del agregado. De esta manera, se observará la separación de fases, al colocar agua en la mezcla de un ácido carboxílico o en su defecto un alcohol en tetrahidrofurano.

En la Tabla 3.1, se presentan los resultados, en función de áreas, del poder extractivo de los SUPRAS elaborados con diversas proporciones de THF/H₂O.

Tabla 3.2. Áreas correspondientes al pico del colesterol en función de la proporción de THF/H₂O con cada surfactante.

	Ácido Decanoico				
	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	Desviación Estándar
40/60	47,54	44,98	46,31	46,28	1,28
60/40	60,62	58,05	52,52	57,06	4,13
30/70	72,58	47,65	48,38	56,20	14,18
70/30	-	-	-	-	-
50/50	51,21	52,69	49,02	50,97	1,84
	n-Octanol				
	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	Desviación Estándar
40/60	37,00	82,65	43,08	54,24	24,78
60/40	-	-	-	-	-
30/70	53,93	49,13	52,57	51,88	2,47
70/30	-	-	-	-	-
50/50	61,12	68,81	68,16	66,03	4,26

Como se puede verificar en la Tabla 3.1, para las proporciones de 70/30 de ácido decanoico, 60/40 y 70/30 de n-octanol, no se lograron obtener resultados favorables, puesto que no se llevó a cabo la coacervación de micelas inversas tanto del ácido carboxílico como del alcohol. Ésta acción se verifica físicamente por la obtención de dos fases luego del proceso de centrifugación. Sin embargo, ésta separación no se llevó a cabo con éxito en las proporciones de THF/H₂O en los surfactantes antes mencionados. Al fenómeno de no obtención de las dos fases en la formación del

SUPRAS, se le puede atribuir un cambio en la solubilidad de los surfactantes en agua. Para este caso es importante conocer la solubilidad que poseen tanto los surfactantes como el THF. Para el n-octanol, la solubilidad en agua es pobre (0,30 mg/L), y lo mismo ocurre con el ácido decanoico. En cambio el THF será completamente miscible en agua. Otro punto a tomar en cuenta es que a nivel del laboratorio, cuando se llevó a cabo la formación de los SUPRAS, tanto el ácido decanoico como el n-octanol se disolvieron completamente en el THF, pero cuando se agrega agua ocurre el fenómeno de la formación de dos fases. Para los casos en los que las proporciones de 70/30 con cada surfactate, no llegaron a la formación de las fases, se puede deducir lo siguiente: al ser la proporción de THF la más alta (70%) de todas las que se propusieron trabajar, y con una solubilidad del 100% en agua, éste tomó el papel de un agente “súper-solubilizante”, es decir, que permitió que tanto el ácido decanoico como el n-octanol lleguen a solubilizarse al entrar en contacto con el agua. En otras palabras, existe mayor cantidad de THF que de surfactante, y dada la excelente solubilidad de éste en agua, no se llevó a cabo la formación de dos fases. Algo similar ocurre también con la proporción de 60/40 con n-octanol. Un efecto contrario sucede con las proporciones restantes de THF/H₂O, puesto que el THF se encuentra en proporciones menores o iguales al agua, impidiendo que los surfactantes se disuelvan en ésta y por lo tanto se lleve a cabo la formación de dos fases.

Así mismo, durante la formación de un solvente supramolecular hay que tomar en cuenta que cuanto menor sea su cadena hidrocarbonada, mayor debe ser la proporción de agua, y por tanto, mejor será el proceso de coacervación [5]. Esta condición se puede verificar en los resultados obtenidos en cuanto a los dos solventes seleccionados como óptimos: ácido decanoico 60/40 y n-octanol 50/50, puesto que para el primero, al ser

una cadena con número de carbonos igual a 10 (ácido decanoico) fue necesaria una menor proporción de agua (40%) que para el segundo caso con número de carbonos igual a 8 (n-octanol), en el que fue necesario colocar una mayor proporción de agua (50%).

Para finalizar la evaluación de éstos parámetros se descartaron algunas de las proporciones, hasta quedar únicamente con las que presentan mayores áreas (Tabla 3.1, casilleros de color rosa), que supone una mayor concentración de colesterol en la muestra y por tanto una extracción más eficiente. Un aspecto importante que se muestra en la Tabla 3.1, son las desviaciones estándar obtenidas para cada conjunto de datos, especialmente las correspondientes al ácido decanoico 30/70 y n-octanol 40/60 (cuadros de coloración verde). Respectivamente, cada una de ellas presenta una desviación de 14,18 y 24,78, desviaciones que son bastante grandes y que representan la falta de repetibilidad entre ellas. Las razones posibles para los resultados obtenidos pueden ser: insuficiente tiempo de agitación (vórtex) o contaminación de material usado; por lo tanto, serán éstas observaciones consideradas para descartar su aceptación como proporciones ideales para la extracción de colesterol en huevo.

Con las proporciones definidas, se llevó a cabo la evaluación de la concentración de cada uno de los surfactantes para la formación del solvente supramolecular, y su posterior uso en la extracción de colesterol en huevo. Es así, que se probaron cantidades de 2% al 8%, como se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.3. Áreas correspondientes al pico del colesterol en función de la concentración de surfactante en el SUPRAS.

	Proporción THF/H ₂ O				
Concentración Surfactante	Ácido decanoico 60/40				
	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	Desviación Estándar
2%	-	-	-	-	-
4%	48,12	43,50	46,37	46,00	2,33
6%	39,90	43,97	36,01	39,96	3,98
8%	47,44	45,16	43,95	45,52	1,77
Concentración Surfactante	n-Octanol 50/50				
2%	-	-	-	-	-
4%	47,49	49,28	50,47	49,08	1,50
6%	40,12	40,46	32,42	37,67	4,55
8%	36,49	36,21	34,39	35,70	1,14

Químicamente, para que se dé lugar a la coacervación de las micelas inversas tanto para el ácido carboxílico como para el alcohol (formación del SUPRAS), debe existir una relación entre agua-surfactante, esta vez refiriéndonos al porcentaje de surfactante. En este caso, la cantidad de agua se mantiene constante respectivamente (40% y 50%) para cada variación en la concentración de surfactante. Como resultado se puede expresar y generalizar que, al añadir más surfactante, el poder extractivo del solvente supramolecular es menor, es decir, que no se lleva a cabo de manera eficiente el proceso de coacervación.

Los resultados mostrados en la Tabla 3.2 muestran casi una relación inversamente proporcional entre la concentración de surfactante presente en el SUPRAS y el área del pico de colesterol. Cuando el solvente supramolecular se encuentra formado por un 8% de surfactante, éste muestra un área menor que al estar formado por un 4% del mismo, ya sea con ácido decanoico o con n-octanol, lo que se considera como una ventaja para el análisis desde el punto de vista costo-beneficio. Un aspecto importante que se debe mencionar es que para los dos surfactantes 2% en cada proporción de THF/H₂O, se llevó a cabo la formación de finísimas capas de extracto supramolecular respectivamente, y como tal, resultó imposible extraer una pequeña muestra para su posterior análisis por GC-FID. Por lo tanto, se desconoce el poder extractivo que puedan tener cada una de ellas.

Finalmente, se realizó una pre-selección de los solventes supramoleculares con mayores áreas y que suponen por ende, una mayor obtención de colesterol durante la extracción, siendo entonces: ácido decanoico 60/40 4%, 6% y 8%, y n-octanol 50/50 4%. De esta manera, se procedió a realizar un análisis de comparación de varianzas ANOVA. Para éste análisis de varianzas, el valor tabulado de F fue de 8,85, con 8 grados de libertad en el numerador y 3 grados de libertad en el denominador, y con una confianza de 95%. La hipótesis nula planteada fue: “no existe diferencia significativa al trabajar con diferentes porcentajes de surfactante en la formación del SUPRAS”.

A continuación en la Tabla 3.3, se presentan los resultados para el ANOVA en cuanto a la optimización del solvente supramolecular respecto al porcentaje de surfactante.

Tabla 3.4. Análisis de varianza de la optimización del porcentaje de surfactante en el SUPRAS.

Origen de la varianza	Grados de libertad	F calculado	Criterio de aceptación	Ho	Resultado
Entre grupos (w)	3	1,71	$F_{cal} < F_{tab}$	Aprobada	No hay diferencia significativa
Dentro del grupo (b)	8				
Total	11				

De acuerdo a los datos mostrados en la Tabla 3.3 se puede deducir que cualquiera de los SUPRAS escogidos como óptimos, pueden ser utilizados para llevar a cabo la extracción de colesterol, puesto que éstos no presentan valores de áreas bastante alejados entre sí. Por lo tanto, se establece que no existe diferencia significativa al usar cada uno de los SUPRAS propuestos. A pesar de ésta última expresión, sobre la inexistencia de diferencias significativas entre los SUPRAS, y conforme a los resultados obtenidos en la tabla 3.2; la concentración de surfactante usada en la presente disertación fue 4% de n-octanol 50/50, en razón de su eficiente y mayor extracción de colesterol (49,08), pero principalmente, por la facilidad de manejo del n-octanol en comparación al ácido decanoico.

Un concepto fundamental a tomar en cuenta, es que la región hidrocarbonada de un compuesto es ideal para extraer compuestos no polares. En este caso, a pesar de que el octanol posee una cadena hidrocarbonada con número menor de carbonos (8 carbonos) en comparación al ácido decanoico (10 carbonos), éste presenta un poder extractivo mayor con la molécula de colesterol (27 carbonos). Esto pudo producirse porque, a pesar de que en el colesterol predomine la presencia de la región hidrocarbonada, ésta

molécula posee como grupo funcional un hidroxilo (OH), ocasionando de esta manera mayor atracción hacia el grupo hidroxilo que posee el n-octanol, que por el carboxilo (COOH) del ácido carboxílico.

Enseguida a la selección del surfactante y la proporción THF/H₂O, se llevó a cabo la optimización de la extracción tomando en cuenta parámetros como: volumen de solvente supramolecular, tiempo de agitación y tiempo de centrifugado. Se presentan los resultados obtenidos para cada parámetro en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Áreas correspondientes al pico de colesterol en función del volumen de SUPRAS.

Volumen (μL)	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	Desviación Estándar
400	149,00	140,39	140,64	143,34	4,90
600	93,62	92,39	92,20	92,73	0,77
800	73,91	72,68	72,46	73,07	0,78
1000	58,68	55,06	59,56	57,76	2,38

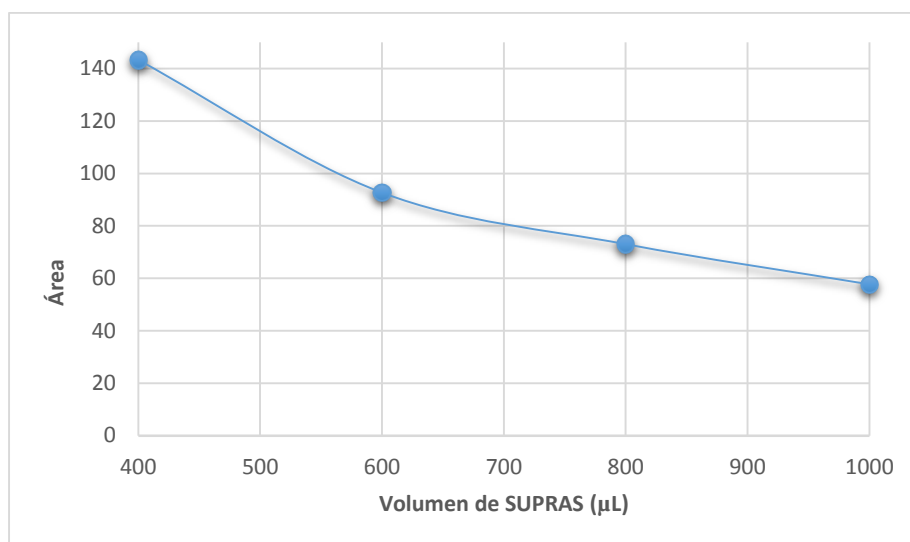


Figura 3.1 Relación de volumen de SUPRAS y área del pico correspondiente a colesterol, obtenido por GC-FID.

Los resultados de las áreas mostrados en la Tabla 3.5, permiten establecer una relación inversamente proporcional (ver Figura 3.1) respecto al volumen de SUPRAS utilizado para la extracción. Es decir, que utilizando menores volúmenes de SUPRAS, mayor será el área del pico de colesterol. Así, con 400 μL de SUPRAS se obtiene una mayor área del pico correspondiente a colesterol, seguido de 600 μL , 800 μL y por último con 1000 μL . A pesar de que existe una mayor dispersión de los resultados con el volumen de 400 μL , éste fue seleccionado como óptimo para realizar los ensayos posteriores, puesto que es menor la desviación estándar es menor al 10% y por tanto, se considera aceptable.

Para la selección de las condiciones óptimas para la extracción de colesterol, es necesario también realizar un análisis ANOVA. La hipótesis nula planteada fue: “no existe diferencia significativa al agregar diferentes volúmenes de SUPRAS”.

A continuación en la Tabla 3.6, se presentan los resultados para el ANOVA para la evaluación del volumen de SUPRAS.

Tabla 3.6. Análisis de varianza de volúmenes de SUPRAS.

Origen de la varianza	Grados de libertad	F calculado	Criterio de aceptación	Ho	Resultado
Entre grupos (w)	3	539.54	$F_{cal} < F_{tab}$	Rechazada	Si hay diferencia significativa
Dentro del grupo (b)	8				
Total	11				

De acuerdo a los resultados que se presentan en la Tabla 3.6 se puede comprobar lo que se había expresado en la Figura 3.1, es decir, que al utilizar cada uno de los volúmenes de SUPRAS para extraer colesterol, éstos no extraen una similar o cercana concentración de colesterol, más bien son valores de áreas bastante alejados. De esta manera se establece que existe diferencia significativa al usar cada uno de los volúmenes de SUPRAS propuestos.

A continuación se evaluó la optimización del tiempo de agitación necesario para la extracción de colesterol, cuyos resultados se expresan en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Áreas correspondientes al pico de colesterol en función del tiempo de agitación.

Tiempo (min)	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	Desviación Estándar
5	113,22	112,02	113,22	112,82	0,69
8	115,49	115,17	100,46	110,37	8,59
10	116,70	118,33	118,07	117,70	0,88
15	120,72	121,42	121,31	121,15	0,38

Para la evaluación de tiempo ideal para que la muestra permanezca en agitación con vórtex, se estableció un rango de tiempo reducido (5-15 minutos) por limitaciones en la disponibilidad del equipo. De acuerdo a los datos de la Tabla 3.7, cuando la muestra se mantiene en agitación por más tiempo, la concentración de colesterol en el extracto supramolecular será mayor, estableciéndose una relación directamente proporcional casi en su totalidad, y que se evidencia en la Figura 3.2. En el tiempo de 8 minutos se tiene una caída en la concentración de colesterol. Este hecho pudo haberse producido por una deficiente agitación por parte del vórtex en la tercera repetición correspondiente a 8 minutos, como se observa en la Tabla 3.7. Sin embargo, las áreas 1 y 2 del mismo tiempo, poseen valores cercanos a 115, por lo que se deduce que, si se cumple con la relación directamente proporcional mencionada anteriormente.

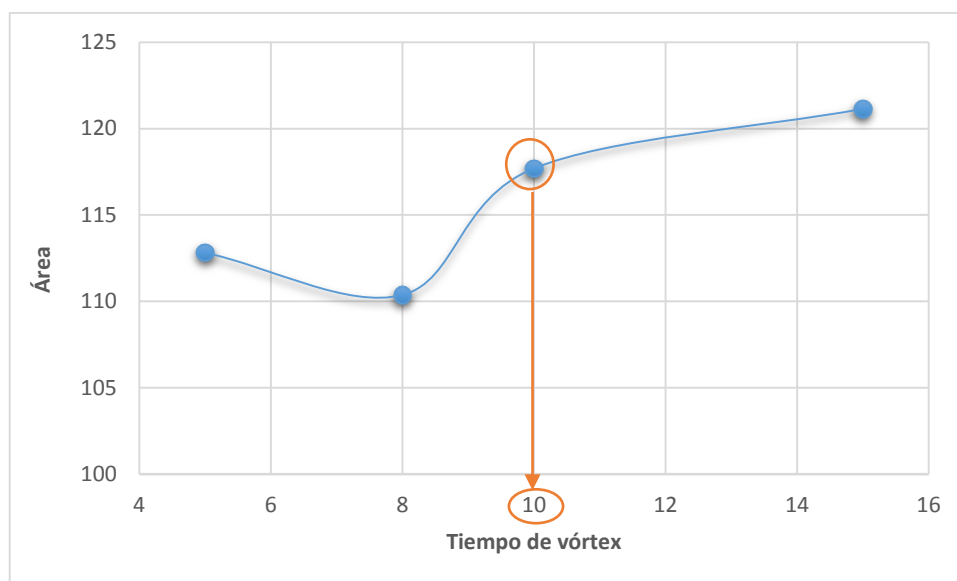


Figura 3.2. Relación del tiempo de agitación de SUPRAS y área del pico correspondiente a colesterol, obtenido por GC-FID.

Tabla 3.8. Análisis de varianza del tiempo de agitación.

Origen de la varianza	Grados de libertad	F calculado	Criterio de aceptación	Ho	Resultado
Entre grupos (w)	3	3,74	$F_{cal} < F_{tab}$	Aprobada	No hay diferencia significativa
Dentro del grupo (b)	8				
Total	11				

Así mismo, se realizó el ANOVA para el tiempo de agitación y así determinar finalmente el óptimo para análisis posteriores. Al igual que en análisis de varianzas del volumen de SUPRAS, para éste análisis el valor tabulado de F fue de 8,85, con 8 grados de libertad en el numerador y 3 grados de libertad en el denominador, y con una confianza de 95%. La hipótesis nula planteada fue: “no existe diferencia significativa al mantener en agitación en diferentes tiempos”.

Dado que el F calculado es menor al F tabulado se da por aprobada la hipótesis nula. Por consiguiente, los valores correspondientes a las áreas del pico de colesterol para cada uno de los tiempos de agitación utilizados, no presentan una mayor variación y por lo tanto, se puede considerar uno de esos tiempos como eficiente para el método de extracción. Por esta razón, se seleccionó para la extracción de colesterol el tiempo correspondiente a 10 minutos por dos razones. Primero, era necesario considerar la funcionalidad del vórtex, puesto que éste únicamente poseía un compartimento para agitar una muestra, es decir, que para los análisis posteriores se requeriría de varias horas para conseguir la agitación de cada uno. Segundo, dado que no existe diferencia significativa entre el tiempo de 15 y 10 minutos, se tomó este último como óptimo para el método de extracción, no viéndose afectada de manera significativa la recuperación de colesterol de las muestras. En conclusión, la mínima pérdida de colesterol en el extracto supramolecular, se justifican con los 5 minutos menos en cuanto al tiempo de agitación de la muestra en el vórtex y la pequeña desviación estándar que éste presenta (ver Tabla 3.7).

El último parámetro evaluado fue el tiempo de centrifugación de la muestra, para el cual se obtuvieron los siguientes datos presentados en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Áreas correspondientes al pico de colesterol en función del tiempo de centrifugación.

Tiempo (min)	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	Desviación Estándar
10	95.32	97.38	95.90	96.20	1.06
12	86.81	99.27	101.89	95.99	8.06
15	103.47	98.04	100.30	100.60	2.73
20	98.47	86.28	95.32	93.36	6.33

Para éste parámetro no se establecen resultados que muestren algún tipo de relación en sí, pero si se puede establecer que una mayor concentración de colesterol se obtiene al centrifugar la muestra por un tiempo de 15 minutos, tal y como se muestra en la Figura 3.3.

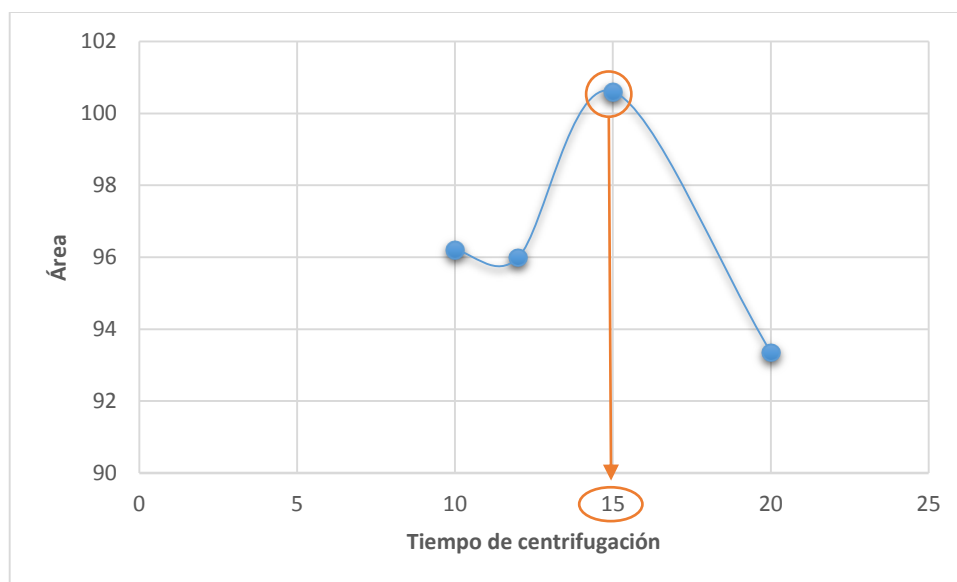


Figura 3.3. Relación del tiempo de centrifugación y área del pico correspondiente a colesterol, obtenido por GC-FID.

A través del análisis ANOVA se determinó la diferencia de las medias entre los tiempos de centrifugación utilizados, análisis cuyo valor de F tabulado fue de 8,85, con 8 grados de libertad en el numerador y 3 grados de libertad en el denominador como en los parámetros anteriores, y con una confianza de 95%. La hipótesis nula planteada fue: “no existe diferencia significativa al mantener la centrifugación en diferentes tiempos”.

Tabla 3.10. Análisis de varianza del tiempo de centrifugación.

Origen de la varianza	Grados de libertad	F calculado	Criterio de aceptación	Ho	Resultado
Entre grupos (w)	3	0,95	$F_{cal} < F_{tab}$	Aprobada	No hay diferencia significativa
Dentro del grupo (b)	8				
Total	11				

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 3.10 respecto al ANOVA, se puede establecer que los valores para cada tiempo de centrifugado de la muestra no se encuentran tan dispersos, y por tanto podría usarse cualquiera de ellos para el método de extracción. Sin embargo, por una mayor obtención en la concentración de colesterol y para facilitar la separación de fases, se decidió trabajar con el tiempo de 15 minutos.

En la Tabla 3.11, se presenta un resumen sobre las condiciones aceptadas para la optimización del solvente supramolecular y para el método de extracción de colesterol en huevos de gallina.

Tabla 3.11. Parámetros seleccionados para la extracción de colesterol con SUPRAS.

Surfactante	n-Octanol
Proporción THF/H₂O	50/50
Concentración surfactante	4%
Volumen SUPRAS	400 µL
Tiempo de vórtex	10 minutos
Tiempo de centrifugado	15 minutos

3.3. Evaluación del desempeño del método

Los parámetros de calidad permiten conocer o determinar si un método analítico es adecuado para la finalidad perseguida y ofrece resultados confiables. En la presente disertación se evaluó: selectividad, exactitud, precisión y efecto matriz, con resultados que se muestran a continuación.

3.3.1. Selectividad

Éste parámetro nos permite conocer la ausencia de interferencias debidas a otras especies contenidas en la matriz, que para este caso, serán especies diferentes al colesterol. De esta manera, se realizaron las lecturas en el cromatógrafo de los testigos mencionados en la sección 2.5.1. Las lecturas de los testigos, una muestra blanco, un estándar y una muestra comercial de huevo (extracto supramolecular), se llevaron a cabo con el fin de comparar si hay o no presencia de algún analito en el tiempo de

retención asignado para el colesterol. En la Figura 3.4, se presentan los cromatogramas obtenidos para la evaluación de éste parámetro.

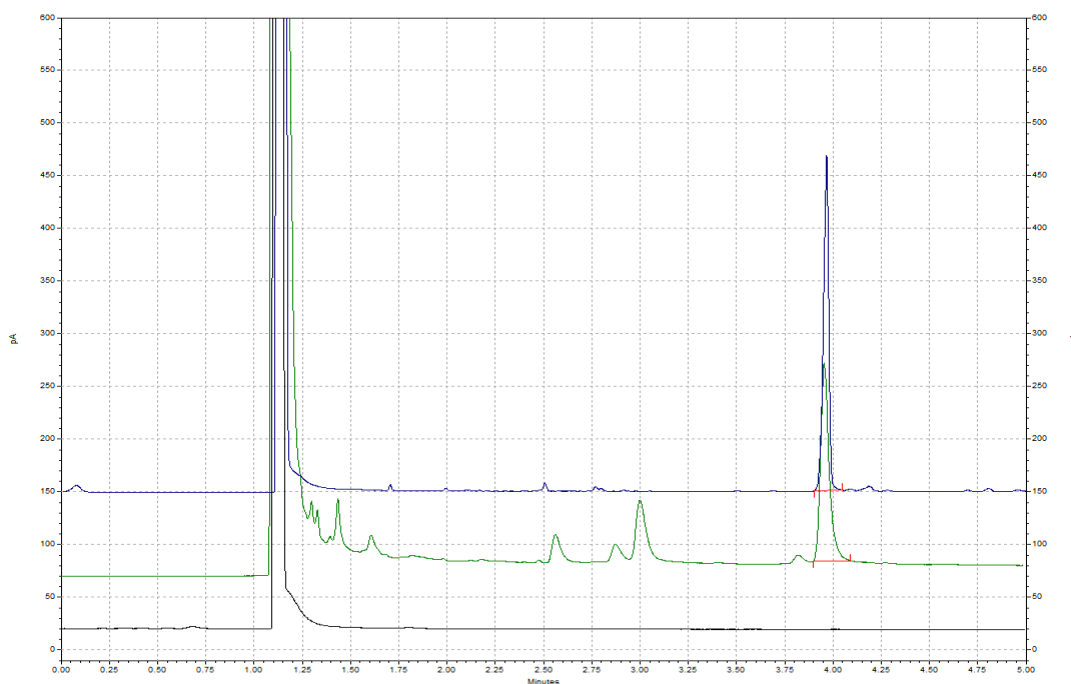


Figura 3.4. Cromatogramas superpuestos del blanco SUPRAS (negro), estándar de colesterol (azul) y extracto SUPRAS de una muestra comercial (verde).

Como se puede observar en la Figura 3.4, el pico que corresponde a la presencia de colesterol se verifica a los 4 minutos en la corrida del estándar, resultado reproducible para la muestra comercial. Para ésta última, los picos presentes entre dos a tres minutos son correspondientes otros componentes también extraídos (posiblemente de estructura similar al colesterol), sin embargo, no interferirán en las lecturas posteriores. Con respecto al gráfico de la muestra blanco, se puede visualizar que a los 4 minutos del tiempo de corrida, no existe presencia de ningún analito, y por tanto, durante los análisis no habrán interferencias que causen algún tipo de error en los resultados. De esta manera, se definió al método como selectivo.

3.3.2. Exactitud

En un principio, la exactitud del método de extracción de colesterol pretendía ser evaluada a través del cálculo del porcentaje de recuperación, sin embargo, no se obtuvieron resultados favorables como se explicará más adelante en el apartado 3.3.4, por lo cual, se procedió a la determinación del sesgo.

El sesgo permite comparar los resultados obtenidos y el valor verdadero del analito. Para determinar este último, se enviaron a analizar muestras de huevos en un laboratorio externo, el cual es acreditado y por ende, puede ofrecer datos confiables y que sirvan de referencia para la evaluación de éste parámetro. El método utilizado por el laboratorio SEIDLA, fue el de la AOAC 970.51 [46]. Éste método propone la saponificación de la muestra, de la cual, la materia insaponificable se lleva a lavados con CHCl_3 , y una posterior evaporación a sequedad completa. El extracto que se obtiene reúne no solo al colesterol, sino al conjunto de esteroides que la muestra pueda contener. Su cuantificación se lleva a cabo mediante cromatografía de gases, a través del método del estándar interno (colestano). La confirmación de colesterol en el extracto, se realiza a través de la adición de anhídrido acético y piridina, permitiendo verificar la presencia de colesterol en forma de acetatos de esteroides.

Para la evaluación de la exactitud del método se analizaron dos muestras comerciales que fueran enviadas también al laboratorio externo. Estas muestras corresponden a IND (huevos Indaves) y CB (huevos criollos). Una vez obtenidos los resultados, se realizaron los cálculos matemáticos y estadísticos (t-student) que se utiliza para

identificar errores sistemáticos (sesgo), comparando la diferencia entre dos medias, de tal manera que se conozca, si las diferencias que existen son estadísticamente significativas. Para el análisis estadístico se utilizaron 2 grados de libertad y una confianza del 95% con dos colas. La hipótesis nula propuesta fue: “no existen diferencias significativas entre el valor de referencia (SEIDLA) y el valor obtenido”. A continuación se presentan los resultados en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12. Determinación de la exactitud del método de extracción de colesterol en base de la muestra IND.

Muestra	Área del pico	Concentración Experimental (Colesterol/100 g)	Concentración SEIDLA (Colesterol/100 g)
IND 1	331,00	362.39	380.00
IND 2	205,15	202.79	417.46
IND 3	333,84	365.99	393.54
	Promedio	310,39	397.00
	Sesgo	86,61	
	N° lecturas	3	
	Desviación Estándar (SD)	93,21	
	t. calculado	0,54	
	t. tabulado (2C/ 0,025)	4,3037	
	Criterio de aceptación	t cal. < t.tab	
	Ho	Aprobada	
	Resultado	No hay diferencia significativa	

Como se puede observar en las Tabls 3.12 y 3.13, los valores respecto al sesgo corresponden a 86,61 y 92,78, valores calculados con la ecuación 1.2, que son altos en comparación a los que normalmente se debe obtener en la evaluación de un método; sin embargo, hay que tomar en cuenta las concentraciones altas de analito que posee la muestra y la complejidad de su composición. Estadísticamente, el sesgo se debe evaluar con la prueba t-student y con el criterio de aceptación de que el t calculado debe ser menor al t tabulado, en esa condición no existirá diferencia significativa y el sesgo será aceptado. Los valores obtenidos para el t calculado en cada una de las muestras corresponden a 0,54 y 1,30; valores que son menores al t tabulado 4,30. Por lo tanto, se establece que no existe diferencia significativa entre el valor de referencia y el valor experimental obtenido, y por lo tanto el método podría ser aplicado.

Tabla 3.13. Determinación de la exactitud del método de extracción de colesterol en base de la muestra CB.

Muestra	Área del pico	Concentración Experimental (Colesterol/100 g)	Concentración SEIDLA (Colesterol/100 g)
CB 1	249,94	259.59	389,03
CB 2	314,98	342.08	403,50
CB 3	285,37	304.52	392,01
	Promedio	302,06	394,85
	Sesgo	92,78	
	N° lecturas	3	
	Desviación Estándar (SD)	41,30	
	t. calculado	1,30	
	t. tabulado (2C/ 0,025)	4,3037	

	Criterio de aceptación	t cal. < t.tab
	Ho	Aprobada
	Resultado	No hay diferencia significativa

3.3.3. Precisión

Para la evaluación de la precisión del método se utilizó la prueba F-Fisher a través de la cual se pueden determinar errores aleatorios. Hay que tomar en cuenta que una vez que concluido el análisis de varianzas (F-Fisher), hay que verificar que se cumpla la condición: “no hay diferencia significativa” o “las dos varianzas no son significativamente diferentes”, y por consiguiente realizar la prueba de significancia t-student. Las varianzas que fueron comparadas corresponden a las muestras IND y CB analizadas en el laboratorio y las muestras analizadas por SEIDLA mostradas en la evaluación de exactitud, en el apartado anterior. Los resultados se presentan en las Tablas 3.14 y 3.15.

Tabla 3.14. Determinación de la precisión del método de extracción de colesterol en base de la muestra IND.

Muestra	Área del pico	Concentración Experimental (Colesterol/100 g)	Concentración SEIDLA (Colesterol/100 g)
IND 1	331,00	362,39	380,00
IND 2	205,15	202,79	417,46
IND 3	333,84	365,99	393,54

	Desviación Estándar (SD)	93,21	18,97
	Varianza	8687,40	359,79
	F calculado	24,15	
	F tabulado	19,00	
	Criterio de Aceptación	F cal. < F. tab	
	Ho	Rechazada	
	Resultado	Si hay diferencia significativa	

Tabla 3.15. Determinación de la precisión del método de extracción de colesterol en base de la muestra CB.

Muestra	Área del pico	Concentración Experimental (Colesterol/100 g)	Concentración SEIDLA (Colesterol/100 g)
CB 1	249,94	259,59	389,03
CB 2	314,98	342,08	403,50
CB 3	285,37	304,52	392,01
	Desviación Estándar (SD)	41,30	7.64
	Varianza	1705,51	58.38
	F calculado	29,21	
	F tabulado	19,00	
	Criterio de Aceptación	F cal. < F. tab	
	Ho	Rechazada	
	Resultado	Si hay diferencia significativa	

El F calculado a partir de la ecuación 1.4 es de 24,15 y 29,21 para cada muestra respectivamente, cada uno con un valor de F crítico de 19,00, es decir que el F

calculado es mayor que el F tabulado, por lo que se rechaza la hipótesis nula, y por lo tanto, el método no es lo suficientemente preciso.

3.3.4. EFECTO MATRIZ

- **Primera fortificación**

Para evaluar el efecto matriz se seleccionaron dos blancos de muestra: clara de huevo y aceite de soya libre de colesterol, siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.5.4.1.

Una de las complicaciones que se tuvo al trabajar con clara de huevo como muestra blanco, fue la formación de un sobrenadante en ésta en el momento en que se llevaba a cabo la fortificación, tal y como se observa en la Figura 3.5. Con la formación de este sobrenadante se dificultó la toma de muestra (200mg) para llevar a cabo la extracción con SUPRAS, pues no se logró una completa homogeneidad y no fue posible tomar correctamente la muestra, a pesar de lo cual, se decidió continuar con la evaluación de las fortificaciones. En este ensayo, no se obtuvieron resultados favorables con ninguno de los volúmenes utilizados para fortificación, hecho que se verificó al no tener visibilidad del pico de colesterol en el tiempo establecido (4 minutos).



Figura 3.5. Vista lateral de la formación del sobrenadante producto de la adición de THF a una muestra de clara de huevo de gallina.

Luego de realizar las lecturas cromatográficas usando como muestra aceite de soya libre de colesterol, se visualizó el pico de colesterol con el volumen de 625 μL de fortificación, y con un área promedio de 52,87 tal y como se tiene en la Figura 3.6.

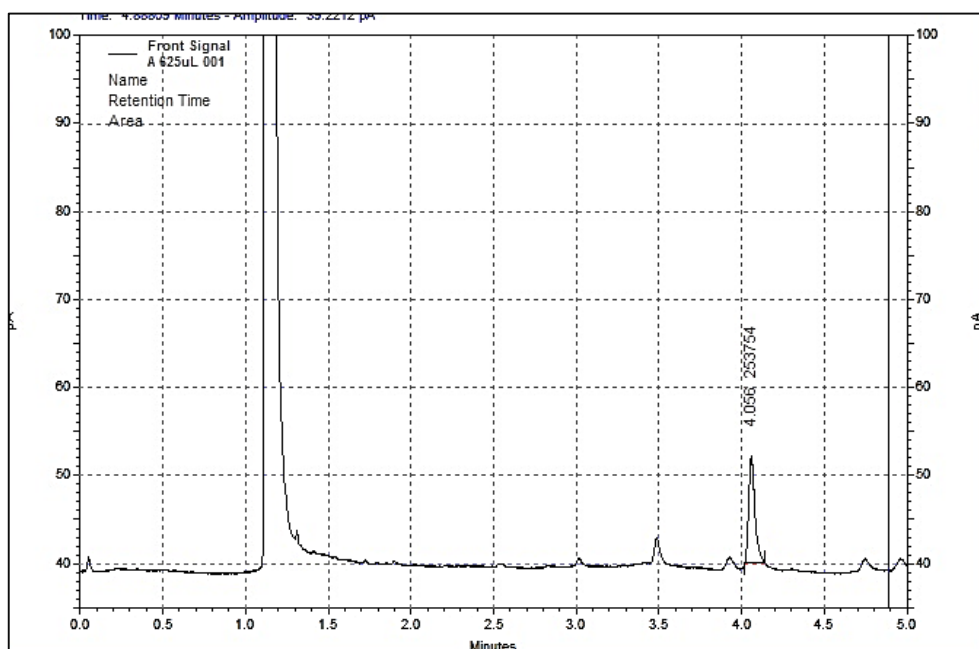


Figura 3.6. Cromatograma de la muestra de aceite fortificada con 625 μL de una solución de 40000 mg/L de estándar de colesterol (escala 100 pA).

Debido a que los resultados de estas fortificaciones no resultaron ser eficientes, tanto por la dificultad en la homogenización de la muestra de clara huevo, y por el área pequeña del pico de colesterol en la muestra de aceite; se decidió realizar una segunda prueba, ésta vez con variaciones tanto en la elección de la muestra blanco como en los volúmenes y concentraciones para fortificarla.

- **Segunda fortificación**

Para ésta fortificación únicamente se trabajó con aceite de soya como muestra blanco, y se siguió la metodología descrita en el apartado 2.5.4.2. Como se puede observar en la Figura 3.7, el pico que corresponde a colesterol no es visible, por lo que se concluye que nuevamente la fortificación no se aplicó eficazmente en la muestra de aceite, posiblemente por fallas en la distribución de las moléculas de colesterol en la matriz.

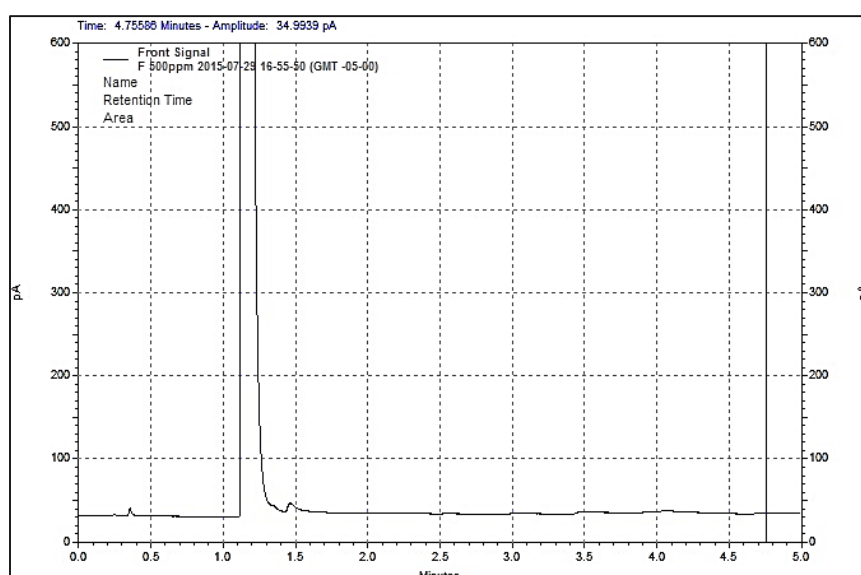


Figura 3.7. Cromatograma de la muestra de aceite fortificado con 500 μ L de una solución de 16000 mg/L de estándar de colesterol (escala 600 pA).

- **Tercera fortificación**

Finalmente, se llevó a cabo una tercera fortificación como se especifica en la metodología descrita en el apartado 2.5.4.3. La diferencia con la segunda fortificación, además de los volúmenes y concentraciones, fue la adición de la solución fortificadora directamente a los 200 mg de muestra necesarios para extraer, con esto lo que se esperaba es evitar la “pérdida” de analito durante el proceso de homogenización. Sin embargo, a pesar de que esta vez se observó la presencia de colesterol, el pico en cada cromatograma no se visualiza de manera simétrica, sino que tiene presencia de cola, tal y como se muestra a continuación en la Figura 3.8.

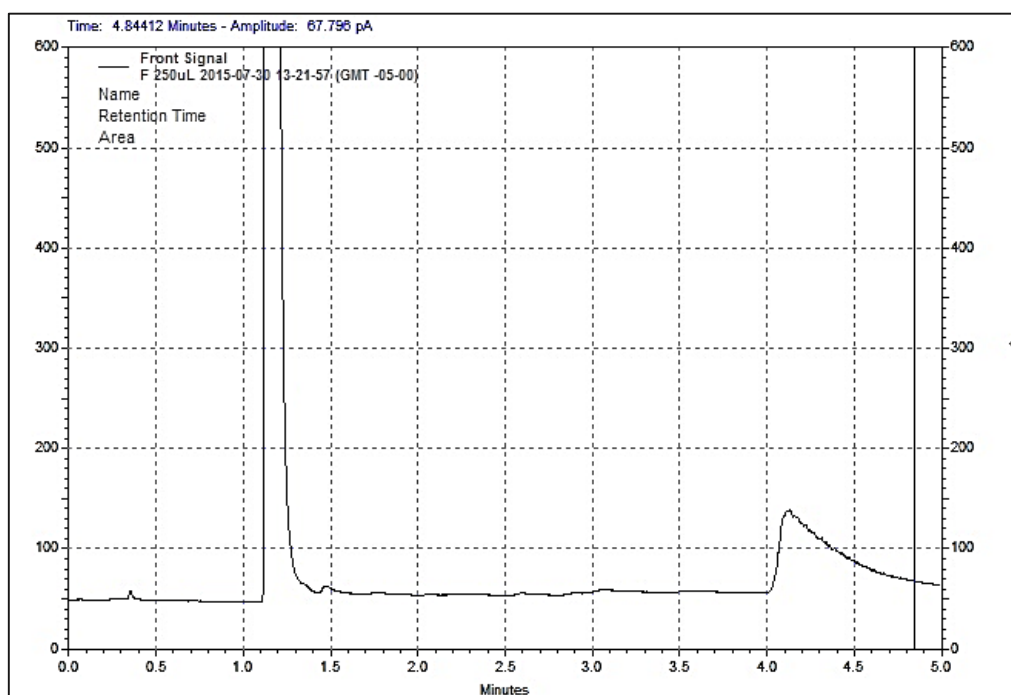


Figura 3.8. Cromatograma de la muestra de aceite fortificado con 200 μ L de una solución de 40000 mg/L de estándar de colesterol (escala 600 pA).

La formación de la cola hacia la derecha informa que, durante la elución, la concentración de analito aumenta rápidamente y luego va decreciendo lentamente, es decir, que las últimas porciones del colesterol están siendo retenidas con mayor fuerza por parte de la fase estacionaria, y por lo tanto, van eluyendo más lentamente dando lugar a la formación de una cola. De esta manera, por los problemas mencionados en cuanto a la asimetría del pico del colesterol, se decidió descartar esta matriz como una opción viable para efectuar las fortificaciones.

Como última opción, se podría haber empleado un material de referencia certificado, sobre el cual se realizarían fortificaciones; sin embargo, esto no fue posible, por lo cual, no se pudo concretar la evaluación de este parámetro.

3.4.Cuantificación de colesterol en muestras comerciales de huevos por cromatografía de gases

La cuantificación de colesterol se realizó a partir de una curva de calibración a cinco niveles de concentración (800 mg/L, 1300 mg/L, 1800 mg/L, 2300 mg/L, 2800 mg/L). Dado que el criterio de aceptación cualitativo para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación (R^2), de acuerdo a los resultados obtenidos de la curva de calibración realizada en el laboratorio se obtuvo un R^2 igual a 0,9911, cumpliendo así con el requerimiento que debe ser mayor a 0,99. En la Figura 3.9, se indica la curva de calibración utilizada para la cuantificación de colesterol. Los resultados de las áreas de las soluciones estándar para la construcción de la curva se presentan en la Tabla 3.16.

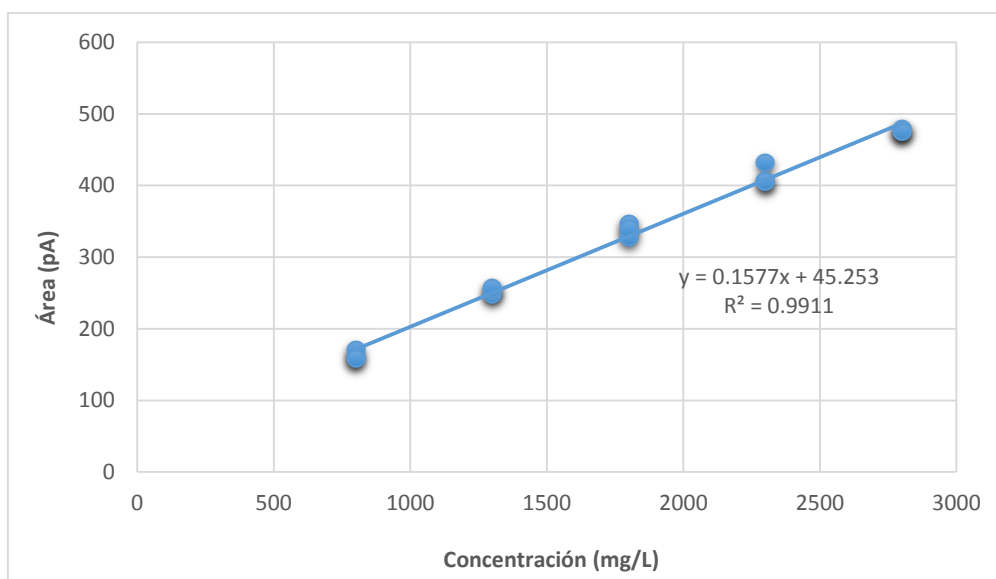


Figura 3.9. Curva de calibración para la cuantificación de muestras de huevo de gallina por CG-FID.

Tabla 3.16. Curva de calibración de colesterol obtenida mediante CG-FID.

Concentración del estándar (mg/L)	Promedio áreas (pA) ²	Desviación estándar
800	166,33	6,78
1300	252,98	4,49
1800	337,84	9,64
2300	414,65	15,20
2800	476,74	2,14

Los resultados de concentración que se obtienen a partir de la curva de calibración corresponden a la concentración de colesterol en el extracto supramolecular después de haber sido extraído con 400 μ L de SUPRAS, y los resultados se presentan en función de

100 g de huevo. A continuación se presenta un ejemplo del cálculo realizado para la primera muestra ORO.

$$x_1 = \frac{1046,69 \text{ mg} \cdot 400 \mu\text{L}}{1000000 \mu\text{L}} = 0,42 \text{ mg}$$

$$x_2 = \frac{0,42 \text{ mg} \cdot 100000 \text{ mg}}{200 \text{ mg}} = 209,34 \text{ mg}$$

Es decir, que la concentración de colesterol en la muestra ORO es de 209 mg por cada 100 g de muestra. En la Tabla 3.17, se detallan las respuestas instrumentales y concentraciones finales para cada muestra de huevos.

Como se observa en la Tabla 3.17 y en la Figura 3.10, la mayor concentración de colesterol la tiene los huevos criollos adquiridos en un lugar denominado A del mercado “Santa Clara” con 357 g por cada 100 g. Resulta imposible comparar los datos reportados en esta disertación, con el valor real de colesterol de los huevos de gallina producidos en Ecuador, ya sean criollos o de granjas industriales, puesto que en nuestro país no existe aún un dato referencial sobre éste componente. Es importante saber entonces, que el contenido de colesterol no es el mismo para los huevos de gallina a nivel mundial, ya que de acuerdo a la USDA (United States Department of Agriculture), la cantidad en miligramos de colesterol que debe tener un huevo por cada 100 gramos es de 372 mg [47]. Mientras que el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España presentan como valor referencial 400 mg de colesterol por cada 100g de huevo [48]. De acuerdo a la Universidad Nacional de Lujan la concentración de

colesterol en huevos procedentes de Argentina corresponde a 449 mg por cada 100 gramos [49]. Entonces, se reafirma el criterio de que no existe un valor establecido para las muestras comerciales de huevos en el Ecuador.

Tabla 3.17. Concentración de colesterol en muestras comerciales de huevos de gallina.

MUESTRAS COMERCIALES	Nombre/ Marca	Código	Promedio áreas (pA)	Desviación estándar	Concentración extrapolada (mg/L)	Concentración por cada 100 g muestra
	Huevos Oro	ORO	210,32	35,05	1046,7	209
	Huevos Bio	BIO	267,53	41,82	1409,5	282
	Huevos de Campo	CAMP	226,04	30,79	1146,4	229
	Huevos Indaves	IND	290,00	73,49	1552,0	310
	Huevos Supermaxi	SUPER	296,01	73,67	1590,1	318
	Huevos Criollos A	CA	326,82	29,35	1785,4	357
	Huevos Criollos B	CB	283,43	32,56	1510,3	302
	Huevos Criollos C	CC	266,08	53,03	1400,3	280
	Huevos St. María	SM	231,17	52,54	1178,9	236
	Huevos Indaves (Omega 3 + Vit, E)	VE	184,12	42,17	880,58	176

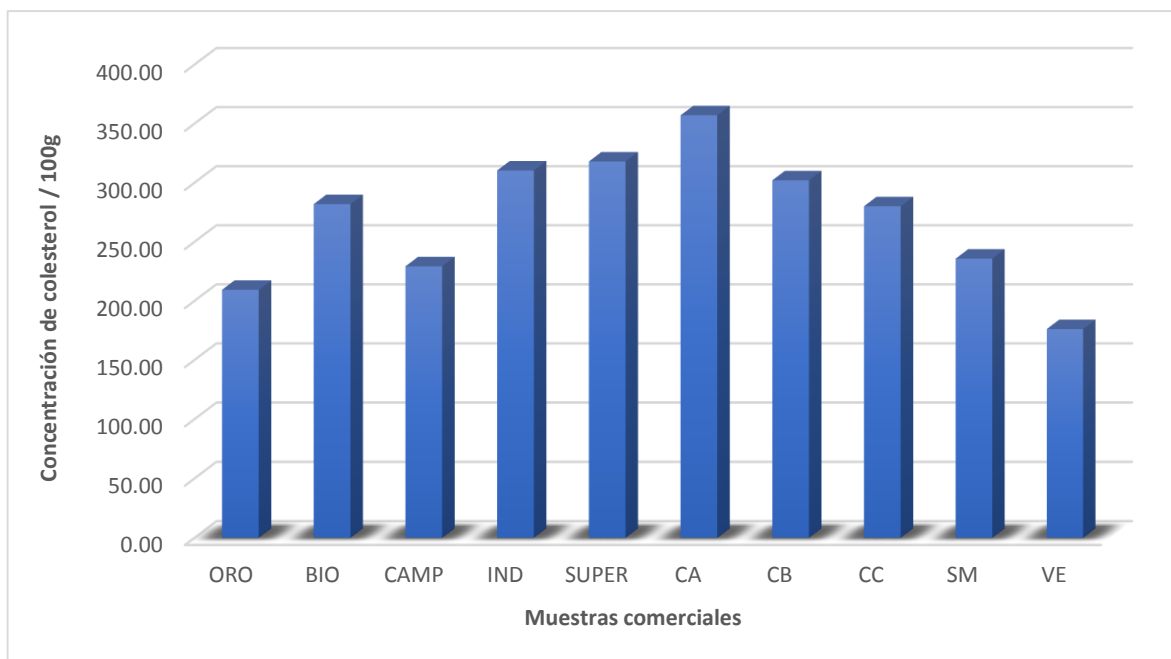


Figura 3.10. Comparación de la concentración de colesterol en muestras comerciales de huevo de gallina.

Con los resultados obtenidos en esta disertación se tiene que, las muestras de huevo Indaves con omega 3 y vitamina E presentan los niveles más bajos de colesterol en comparación a las muestras restantes, con un valor de 176,12 mg/100g. Aunque no se encuentran datos bibliográficos sobre la composición de este tipo de huevos, se encontró un reportaje acerca de los mismos [50]. A partir de los datos obtenidos en laboratorio, se puede observar que los huevos enriquecidos con omega 3, no presentarán los mismos niveles de colesterol que los huevos criollos o los procesados, es decir, que al presentar más contenido de este ácido graso en su composición, la concentración de colesterol se reducirá, y las ventajas de consumir huevos serán mayores. Sin embargo, se recomienda realizar un estudio con un número muestral representativo para corroborar esta información.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- El método de extracción con SUPRAS es un método calificado como selectivo, puesto que a través de la evaluación de los tres testigos (estándar, muestra comercial y blanco SUPRAS), se observó que el pico del colesterol eluye alrededor de los 4 minutos para el estándar y la muestra comercial; mientras que para el blanco de SUPRAS, no se visualizó ningún pico en ese tiempo, por lo que indica la absoluta ausencia de alguna interferencia que conlleven errores en los resultados.
- La exactitud del método fue evaluada mediante el sesgo, tomando como valor verdadero el que se obtuvo de un laboratorio externo acreditado (SEIDLA). De esta manera, la prueba t-student, permitió determinar que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos en este estudio y los referenciales.
- La precisión del método fue evaluada a través de la prueba F-Fisher y con los datos también proporcionados por SEIDLA. Éste estadístico, expresó la existencia de una diferencia significativa entre ambos métodos, por lo que la aplicabilidad del método desarrollado es limitada.

- El efecto matriz no pudo ser evaluado en razón de resultados nulos en las fortificaciones ensayadas.
- El uso de una mezcla de solventes para la producción de un disolvente supramolecular (SUPRAS), contribuye a la formación eficaz del agregado molecular de las moléculas de surfactante; en este caso, la adición de agua a la mezcla de tetrahidrofurano con ácido carboxílico o alcohol.
- La formación del SUPRAS se visualiza por la obtención de dos fases, la primera que corresponde a una disolución en equilibrio y la segunda al solvente supramolecular.
- La formación de un coacervado a partir de ácidos carboxílicos o alcoholes, solo se llevará a cabo si la proporción de agua es igual o mayor a la del solvente; para este caso THF, con una proporción de THF/H₂O de 50/50 de n-octanol.
- La proporción de surfactante guarda una relación inversamente proporcional con el área del pico de colesterol, es decir que a menor concentración de surfactante en la producción de SUPRAS, mayor será la extracción de colesterol en la muestras; siendo el más óptimo el 4% de n-octanol 50/50.
- El tiempo de agitación y centrifugado de la muestra no influye en el resultado final de la extracción, al contrario del volumen de SUPRAS, el cuál mostró ser determinante en la cantidad de colesterol extraído.

- La cuantificación de colesterol en las muestras comerciales adquiridas en la ciudad de Quito permitió conocer que la mayor concentración de éste compuesto fue encontrada en una muestra de huevos criollos del mercado “Santa Clara” con una concentración de 357,09 g por cada 100 g de muestra; en contraste a la muestra de huevos procesados Indaves con omega 3 y vitamina E, que fue la muestra con menor concentración de colesterol con 176,12 mg por cada 100 g de muestra.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda realizar una investigación de extracción de colesterol con SUPRAS utilizando variedades de surfactante con cadenas hidrocarbonadas mayores a 10 carbonos, para verificar el poder extractivo sobre la molécula de colesterol a partir de surfactantes que poseen mayor número de carbonos en su estructura.
- Dependiendo de la composición del SUPRAS, se podría ampliar las variables para la optimización del método de extracción, tales como: cambio de pH, variación en la temperatura, entre otras; con el fin de poder tener un control más estricto que permita llevar a cabo una extracción eficiente.

- Se recomienda buscar un blanco (muestra sin analito de interés) que posea similares propiedades físicas que la muestra de análisis, con el fin de realizar fortificaciones y evaluar la existencia de efecto matriz.
- Se recomienda realizar un estudio sobre la composición de los huevos comercializados en el Ecuador, puesto que no existen información sobre la composición de éste alimento, y que sería de gran aporte a la comunidad.
- Si se va a realizar la determinación de colesterol por GC-FID, se sugiere realizar revisiones periódicas en el cromatógrafo de gases, ya sea: inyector, columna o detector, puesto que éstos componentes son vulnerables a sufrir contaminación por residuos de muestra, especialmente por la complejidad en la composición del huevo de gallina.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Luque, M., Valcárcel, M., Tena, M. (1993). *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico*. 1^{era} edición, Editorial Reverté, Barcelona.
- [2] García Bernal, E., De los Ríos, A., Hernández, F., Larrosa, A., Ginestá, A., Sánchez, S., Lozano, L. (2001). *Aplicaciones de los líquidos iónicos en la Industria Química*. Investigación ETSII, Universidad Politécnica de Cartagena. Murcia, España.
- [3] Ballesteros, A., Sicilia, M., Rubio, S., (2010). Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds: A review, *Analytica Chimica Acta*. 677 (2). 108–130.
- [4] Luque, N., Ballesteros, A., Rubio, S. (2011). Análisis de compuestos perfluorados en suero sanguíneo mediante micro extracción con disolventes supramoleculares y cromatografía líquida/ espectrometría de masas con trampa iónica,
<http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/6878/nanouco34.pdf?sequence=1>, 01 de Junio del 2015.
- [5] Ballesteros, A. (2012). Diseño y aplicación de disolventes y adsorbentes supramoleculares para la extracción de contaminantes en alimentos y muestras ambientales (tesis doctoral), Universidad de Córdoba. España.
- [6] MedlinePlus. (2013). Niveles altos de colesterol en la sangre,
<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000403.htm>, 01 de octubre del 2015.

- [7] European Food Information Council. (2015). Seguridad Alimentaria y Calidad, <http://www.eufic.org/page/es/page/FAQ/faqid/cholesterol-eggs/>, 03 de Junio del 2015.
- [8] The Free Dictionary. (2013). Supra-, <http://es.thefreedictionary.com/supra->, 13 de junio del 2015.
- [9] Ghershman, E. (2002). Química Supramolecular, <http://www.geocities.ws/edug2406/supramolecula.htm>, 13 de junio del 2015.
- [10] Corzo, J. (2005). Interacciones no Covalentes, <http://bioquibi.webs.ull.es/temascompletos/InteraccionesNC/inicio.htm>, 16 de junio del 2015.
- [11] Corzo, J. (2005). Movimiento Dipolar. <http://bioquibi.webs.ull.es/bioquimica%20estructural/Archivoszip/enlacesnocovalentes/Fuerzas%20de%20Van%20der%20Waals.pdf>, 16 de junio del 2015.
- [12] Burns, Ralph. (2003). *Fundamentos de Química*. 4^{ta} edición. Pearson Education. San Diego.
- [13] González, J, (2012), Fuerzas Intermoleculares, <http://www.ehu.eus/biomoleculas/moleculas/fuerzas.htm>, 25 de junio del 2015.
- [14] Reyes, V. (2012). *Síntesis de nuevos oxaazaciclofanos y sus estudios de reconocimiento molecular dirigidos hacia cationes orgánicos*. Disertación de Ingeniería en Química. Universidad de Sonora. México.
- [15] ERGONOMISTA. (2004). Fuerzas Intermoleculares, <http://www.elergonomista.com/quimica/fi.html>, 25 de junio del 2015.

- [16] Español-diccionario. (2015). Supramolécula, <http://espanol-diccionario.com/definiciones/?word=supramolecule>, 30 de junio del 2015,
- [17] Cao, R., Fragoso, A., Almirall, E., Villalonga, R. (2003). The Supramolecular Chemistry of Cyclodextrins in Cuba. *Supramolecular Chemistry Journal*. 15(3). 161–170.
- [18] García, A. (2009), Coacervados y Hemimicelas/Admicelas como sistemas extractantes de alteradores endocrinos (tesis doctoral), Universidad de Córdoba, Córdoba, España.
- [19] Hernández, J. (2013). Química Supramolecular (trabajo investigativo), Universidad de Pinar del Río. Cuba.
- [20] Gangula, S., Suen, S., Conte, E. (2010). Analytical applications of admicelle and hemimicelle solid phase extraction of organic analytes. *Microchemical Journal*. 95(1). 2-4.
- [21] Carrero, I., Herráez, A. (2014). Micelas. <http://biomodel.uah.es/model2/lip/micelas.htm>. 7 de junio del 2015.
- [22] Merino, S. (2011). Micelas. <http://www.dx.cat/bitstream/handle/10803/1805/2.INTRODUCCION.pdf?sequence=3>. 11 de junio del 2015.
- [23] J. S Florez, L. E Sereno, J. J Silber, N. M Correa, P. G Molina. (2009). Efecto de la interfaz sobre el comportamiento electroquímico de $K_4[Fe(CN)_6]$ en micelas inversas de cloruro de bencil-n-hexadecildimetilamonio (tesis doctoral), Universidad Nacional Río Cuarto, Argentina.

- [24] Pedraza, A. (2009). *Nuevos métodos químico-analíticos basados en procesos de agregación molecular competitiva*. 1^{era} edición. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba. España.
- [25] Mesa, A. (2008). Los Tensioactivos. <http://quimiorg8.blogspot.com/2008/10/los-tensioactivos.html>. 14 de junio del 2015.
- [26] Barraza, V., Cogollo, K. (2010). Bondades de fruto de jaboncillo (*Sapindus Saporita*) como un detergente biodegradable, <http://www.botanical-online.com/monografias/jaboncillo.htm>, 14 de junio del 2015.
- [27] Fuentes, C., Román, A. (2001). *Los Surfactantes: clases, propiedades y usos*. 1era edición. CIAT Editorial. Cali, Colombia.
- [28] M,A, & Partners Solutions S.L. (2010). Detergencia: conceptos generales. <http://www.mapsol.es/chemieleaksdetergencia.html>, 15 de junio del 2015.
- [29] López, F. (2013). *Sistemas Supramoleculares para la extracción de contaminantes orgánicos* (tesis doctoral). Universidad de Córdoba. Córdoba. España.
- [30] Seese, W., Daub, W. (2005). *Química*. 7ma edición. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. Estado de México.
- [31] Primo, E. (2002). *Química Orgánica, básica y aplicada*. 1era edición. Editorial Reverté, S.A. Valencia, España.
- [32] Albores, M., Caballero, Y., González, Y., Pozas, R. (2006). *Grupos Funcionales: Nomenclatura y Reacciones Principales*. 1ra edición. D.R. México.


- [33] Cardeñosa, V., Lunar, L., Rubio, S, (2011), Generalized and rapid supramolecular solvent-based sample treatment for the determination of annatto in food, *Journal of Chromatography A*, 1218 (50), 8996–9002,
- [34] ECODES, (2011), Compuestos perfluorados (PFCs) presentes en el agua del grifo y los alimentos, <http://ecodes.org/noticias/los-compuestos-perfluorados-pfcs-estan-en-el-agua-del-grifo-y-los-alimentos-y-afectan-la-salud#.VYPXDfntmko>, 8 de junio del 2015.
- [35] Costi, M., Sicilia. D., Rubio, S. (2010). Supramolecular solvents in solid sample microextractions: Application to the determination of residues of oxolinic acid and flumequine in fish and shellfish. *Journal of Chromatography A*, 1217 (9), 1447-1454.
- [36] Skoog, D., Holler, J., Crouch, S, (2008). *Principios de Análisis Instrumental*. 6ta edición, Edamsa Editorial, México.
- [37] Barquero, M. (2006). *Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases*. 1era edición, San José C.R. Editorial. Costa Rica.
- [38] Robinson, J., Skelly, E., Frame, G. (2014). *Undergraduate Instrumental Analysis*. 7ma edición, Taylor and Francis Group Editorial. Florida. Estados Unidos.
- [39] Olguín, L., Rodríguez, H., (2004). Métodos en Biotecnología: Cromatografía de Gases. http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_gases.pdf, 10 de julio del 2015.
- [40] Bender, C., Berliner, L. (2004). *Instrumental Methods*. 1ra edición, Softcover Editorial. New York. Estados Unidos.

- [41] Universidad Nacional de la Plata. (2009). Cromatografía Gaseosa. http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/qa3/Clases_Teoricas/CROMATOGRAFIA_GASEOSA.pdf, 12 de julio del 2015.
- [42] Universidad Autónoma de Madrid. (2010). Introducción al Análisis Instrumental. https://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/lhh345a/InstrumentalLecc1.pdf, 12 de julio del 2015.
- [43] Food and Agriculture Organization. (2012). Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s15.htm>, 13 de julio del 2015.
- [43] Gómez, S., Sierra, M., Pérez, A. (2010). *Análisis Instrumental*. 1ª edición. Gesbiblo, S, L. España.
- [44] Pedraza, A. (2010). *Nuevos métodos químico-analíticos basados en procesos de agregación molecular competitiva*. Instituto de Salud Pública de Chile. Santiago. Chile.
- [45] Boqué, R. (2010). La selectividad en Análisis Químico. <http://rodi.urv.es/quimio/general/selectividad.pdf>, 15 de julio del 2015.
- [46] Association of Official Agricultural Chemists, (2005). *Official Methods of Analysis*, 18^{va} edición, 4ta revisión (2011), Curnut Through, USA.
- [47] United States Department of Agriculture. (2014). *National Nutrient Database for Standard Reference Release 27. Basic Report: Egg, whole, raw, and fresh*. United States.

- [48] Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España, (2010). *La composición del huevo*. España.
- [49] Universidad Nacional de Lujan. (2012). *Tabla de composición de alimentos: Huevos y derivados (Argentina)*. Buenos Aires. Argentina.
- [50] Moanack, G. (2005, 20 de Junio). Huevos sin colesterol. *El Tiempo*. Pp 7.

ANEXOS

ANEXO 1. CERTIFICADO DEL ESTÁNDAR DE COLESTEROL



Certificate of Analysis

1.03672.5000 Cholesterol from wool fat extra pure, powdered Ph Eur,BP,NF,JP
Batch K46843772

	Spec. Values		Batch Values	
Assay (Total sterols) (GC, calc. on dried substance)	97.0 - 103.0	%	100.2	%
Assay (Cholesterol) (GC, calc. on dried substance)	≥ 95.0	%	96.3	%
Identity (IR-spectrum)	passes test		passes test	
Identity (Identification 1 (Ph. Eur.))	passes test		passes test	
Identity (Identification 2 (Ph. Eur.))	passes test		passes test	
Identity (Identification 3 (NF, JP))	passes test		passes test	
Appearance	almost white crystalline powder with at most a brownish yellow tone		passes test	
Solubility in ethanol	passes test		passes test	
Melting point	147 - 150	°C	148.6	°C
Spec. rotation (α 25/D, 20 g/l, dioxane, calc. on dried substance)	-34 to -38	°	-35.6	°
Acidic substances	passes test		passes test	
Acetone (HS-GC)	≤ 0.5	%	≤ 0.5	%
Ethanol (HS-GC)	≤ 0.5	%	≤ 0.5	%
Heptane (HS-GC)	≤ 0.5	%	≤ 0.5	%
Methanol (HS-GC)	≤ 0.3	%	≤ 0.3	%
Other residual solvents (ICH (Q3C))	excluded by manufacturing process		excluded by manufacturing process	
Sulfated ash (600 °C)	≤ 0.1	%	< 0.1	%
Loss on drying (4 h, 60 °C, vacuum)	≤ 0.3	%	< 0.1	%

Corresponds to Ph. Eur., BP, NF, JP.

Date of examination (DD.MM.YYYY) 09.07.2015
 Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.07.2020

Dr. Christian Urban
 Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0


EMD Millipore Corporation - A division of Merck KGaA, Darmstadt, Germany

290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Phone: (978) 715-4321

SALSA 99000023493B/ V. 322547 Date: 09.07.2015

Page 1 of 1

**ANEXO 2. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE COLESTEROL MUESTRA CB
(SEIDLABORATORY)**

 SEIDLABORATORY Cía. Ltda. SERVICIO INTEGRAL DE LABORATORIO	<p>Melchor Toaza N61-63 entre Av. del Maestro y Nazareth Telfs.: 248 3145 / 280 8849 / 247 6314 Telefax: 280 8825 • www.seidlaboratory.com Quito - Ecuador</p>
---	--

INFORME DE ENSAYO NR. 99910

TIPO MUESTRA: Declarada por el cliente como:	CB
CODIGO LABORATORIO:	99910- 1
TIPO DE PRODUCTO:	CB
CLIENTE:	CINTYA DELGADO
DIRECCION:	LA GASCA Y ALEJANDRO DE VALDEZ
CONDICION LLEGADA Y TIPO DE ENVASE	ENVASE PLÁSTICO CON TAPA
NUMERO DE LOTE:	ND
FECHA RECEPCION:	15/08/19
FECHA INICIO ENSAYO:	15/08/19
CONTENIDO DECLARADO:	ND
CONTENIDO ENCONTRADO:	150 ml
FECHA DE ELABORACION:	ND
FECHA DE CADUCIDAD:	ND
CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA:	Temperatura 4 ° C Humedad relativa 29,5 %
FORMA DE CONSERVACIÓN:	REFRIGERACIÓN
MUESTREO:	ES RESPONSABILIDAD DEL CLIENTE

ENSAYOS FISICO QUIMICOS	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Colesterol	COLORIMÉTRICO	mg/100g	389.03
Colesterol	COLORIMÉTRICO	mg/100g	403.50
Colesterol	COLORIMÉTRICO	mg/100g	392.01

NS: No solicita el cliente/ ND: No declara.

Datos tomados del cuaderno de FQ 80 Pág. 170B

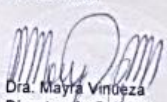
Los resultados expresados arriba tienen validez solo para la muestra analizada en condiciones específicas no siendo extensivo a cualquier lote.

El laboratorio no se responsabiliza por la representabilidad de la muestra respecto a su origen y sitio del cual fue tomado

Este informe no será reproducido, excepto en su totalidad con la aprobación del Director Técnico

• **Tiempo de almacenamiento de informes:** Cinco años a partir de la fecha de ingreso de la muestra

Atentamente,



Dra. Mayra Vinuesa
Director de Calidad
Director Técnico (E)

15/09/04
FECHA EMISION

Página 1 de 1

Tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio
Muestras perecibles: 8 días calendario. Muestras no perecibles: 30 días calendario
Si desea repetición de algún parámetro, se debe generar una solicitud en el período establecido.

**ANEXO 3. CERTIFICADO ANÁLISIS DE COLESTEROL MUESTRA IND
(SEIDLABORATORY)**

 SEIDLABORATORY Cía. Ltda. SERVICIO INTEGRAL DE LABORATORIO	Melchor Toaza N61-63 entre Av. del Maestro y Nazareth Telfs.: 248 3145 / 280 8849 / 247 6314 Telefax: 280 8825 • www.seidlaboratory.com Quito - Ecuador
---	--

INFORME DE ENSAYO NR. 99912

TIPO MUESTRA: Declarada por el cliente como:	IND
CODIGO LABORATORIO:	99912- 1
TIPO DE PRODUCTO:	IND
CLIENTE:	CINTYA DELGADO
DIRECCION:	LA GASCA Y ALEJANDRO DE VALDEZ
CONDICION LLEGADA Y TIPO DE ENVASE	ENVASE PLÁSTICO CON TAPA
NUMERO DE LOTE:	ND
FECHA RECEPCION:	15/08/19
FECHA INICIO ENSAYO:	15/08/19
CONTENIDO DECLARADO:	ND
CONTENIDO ENCONTRADO:	150 ml
FECHA DE ELABORACION:	ND
FECHA DE CADUCIDAD:	ND
CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA:	Temperatura 4 ° C Humedad relativa 29,5 %
FORMA DE CONSERVACIÓN:	REFRIGERACIÓN
MUESTREO:	ES RESPONSABILIDAD DEL CLIENTE

ENSAYOS FISICO QUIMICOS	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Colesterol	COLORIMÉTRICO	mg/100g	380,00
Colesterol	COLORIMÉTRICO	mg/100g	417,46
Colesterol	COLORIMÉTRICO	mg/100g	393,54

NS: No solicita el cliente/ **ND:** No declara.

Datos tomados del cuaderno de FQ 79 Pág. 222A

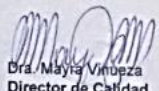
Los resultados expresados arriba tienen validez solo para la muestra analizada en condiciones específicas no siendo extensivo a cualquier lote.

El laboratorio no se responsabiliza por la representabilidad de la muestra respecto a su origen y sitio del cual fue tomado

Este informe no será reproducido, excepto en su totalidad con la aprobación del Director Técnico

• **Tiempo de almacenamiento de informes:** Cinco años a partir de la fecha de ingreso de la muestra

Atentamente,

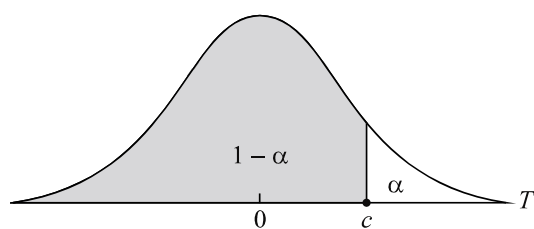

Dra. Mayra Vinuesa
Director de Calidad
Director Técnico (E)

15/09/11
FECHA EMISION

Página 1 de 1

Tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio
Muestras perecibles: 8 días calendario. Muestras no perecibles: 30 días calendario
Si desea repetición de algún parámetro, se debe generar una solicitud en el período estipulado

ANEXO 4. TABLA DE DISTRIBUCIÓN T DE STUDENT



	$1-\alpha$							
r	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	0.975	0.99	0.995
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921

17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60	0.679	0.848	1.046	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576

ANEXO 5. TABLA DE DISTRIBUCIÓN F DE FISHER

Grados de libertad del numerador

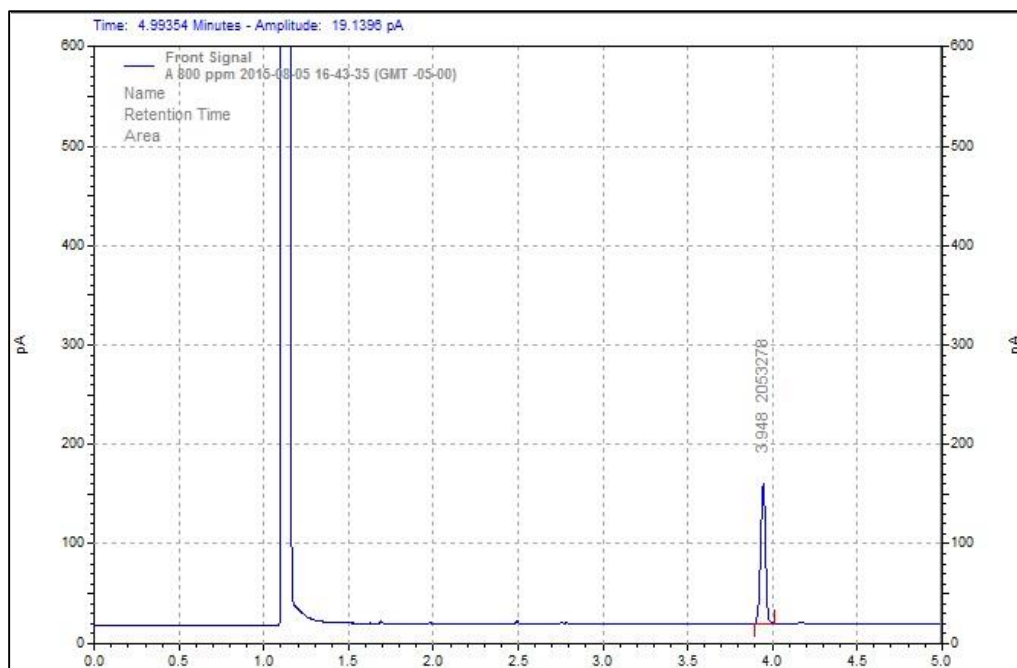
Grados de libertad del denominador

	1	2	3	4	5
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711

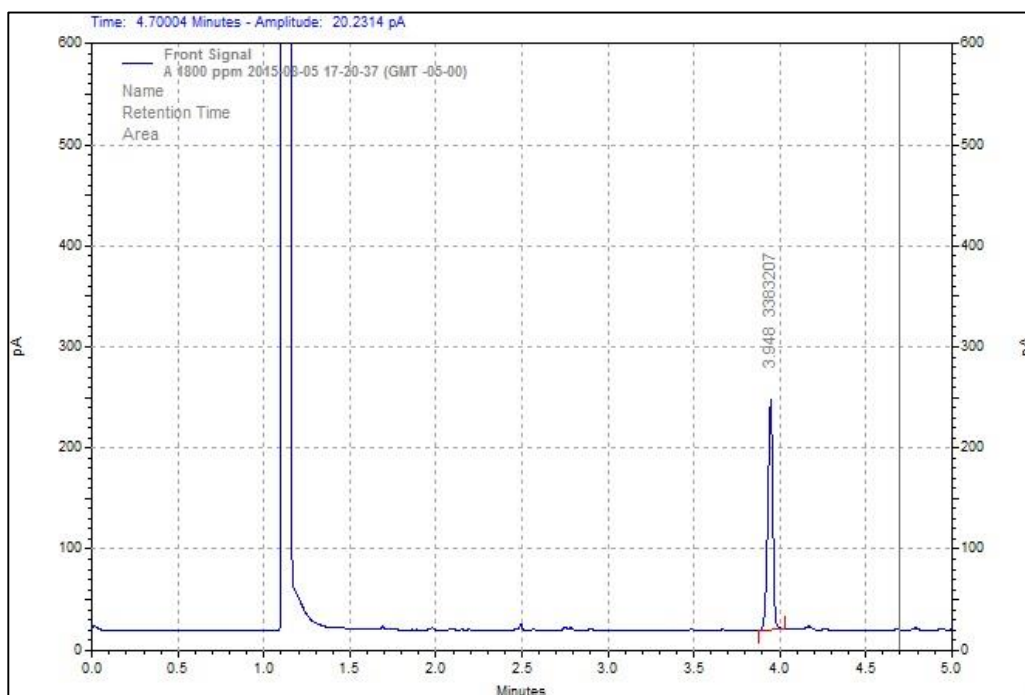
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534
35	4.121	3.267	2.874	2.641	2.485
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449
45	4.057	3.204	2.812	2.579	2.422
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400
60	4.001	3.150	2.758	2.525	2.368
70	3.978	3.128	2.736	2.503	2.346
80	3.960	3.111	2.719	2.486	2.329
90	3.947	3.098	2.706	2.473	2.316
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305
120	3.920	3.072	2.680	2.447	2.290

ANEXO 6. CROMATOGRAMAS DE ESTÁNDARES (800-2800 mg/L)

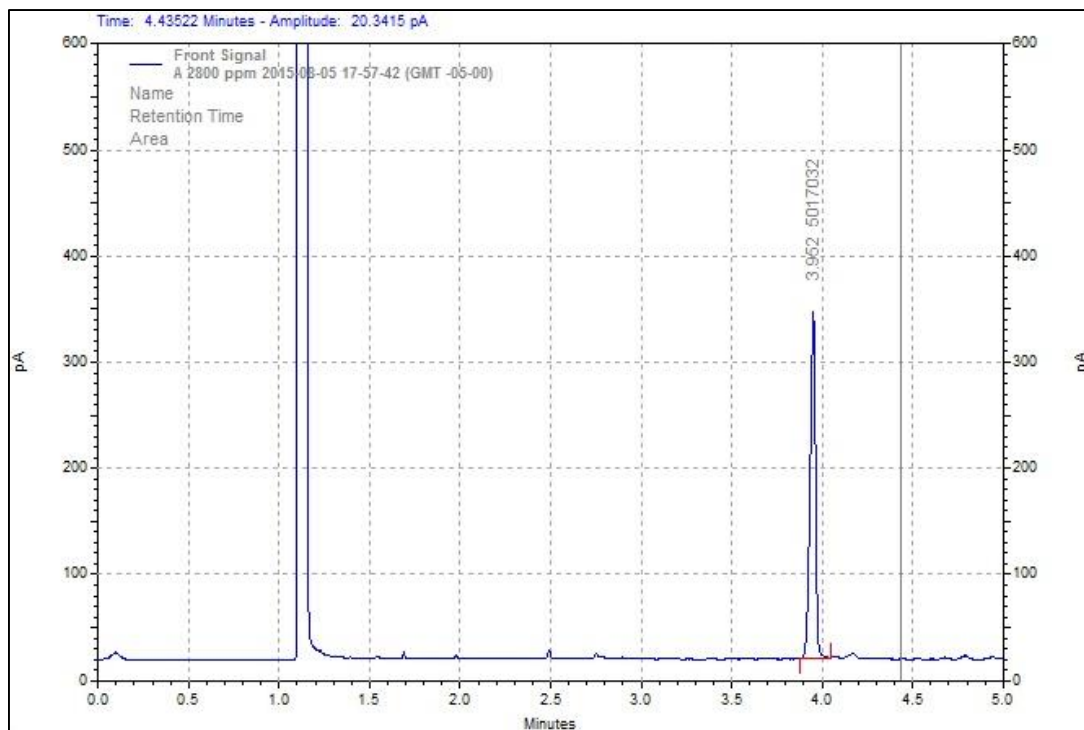
ANEXO 6.1. Estándar de 800 mg/L.



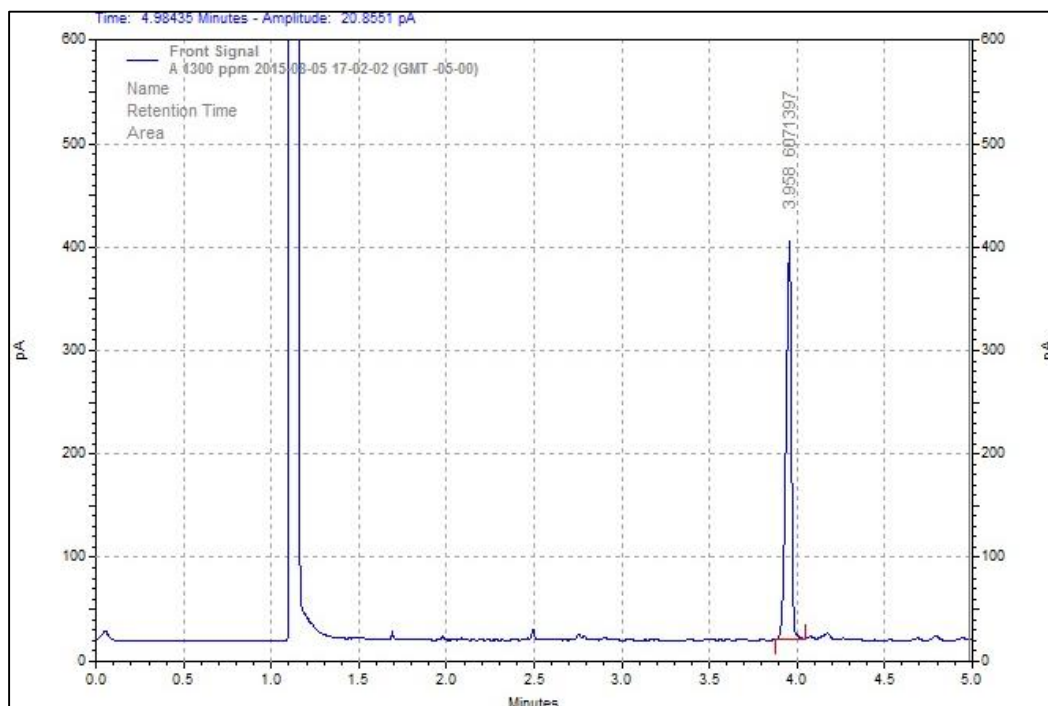
ANEXO 6.2. Estándar de 1300 mg/L



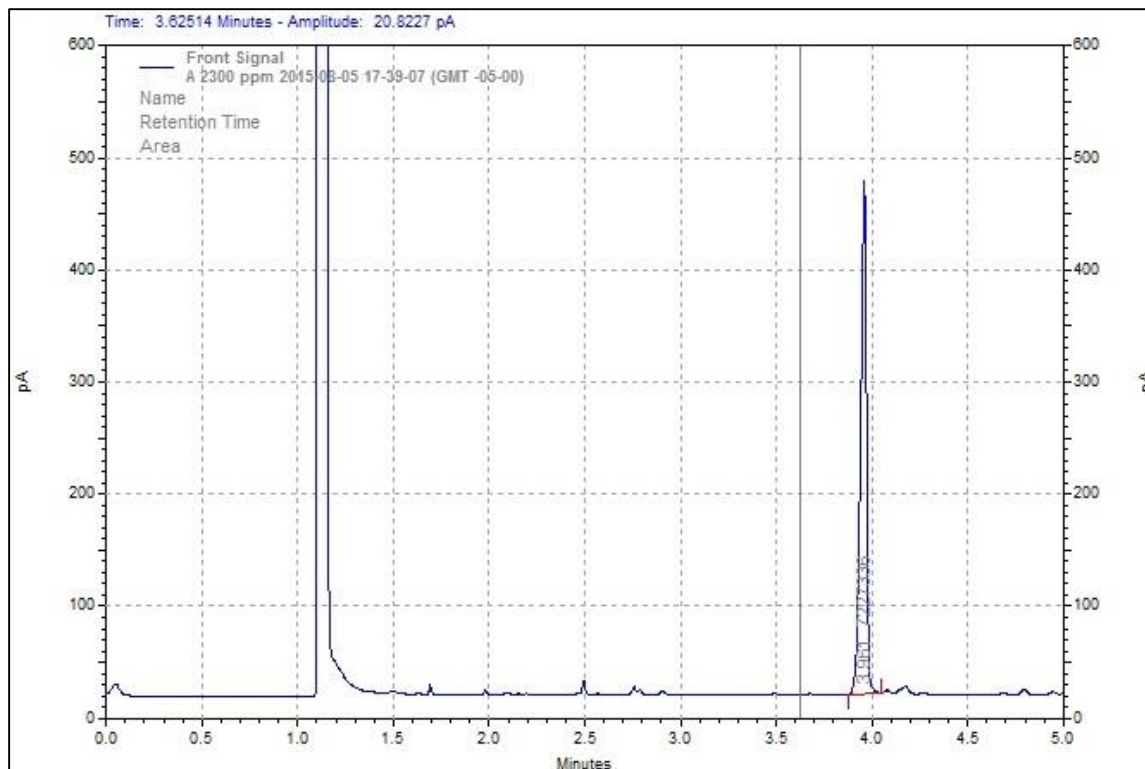
ANEXO 6.3. Estándar de 1800 mg/L.



ANEXO 6.4. Estándar de 2300 mg/L.

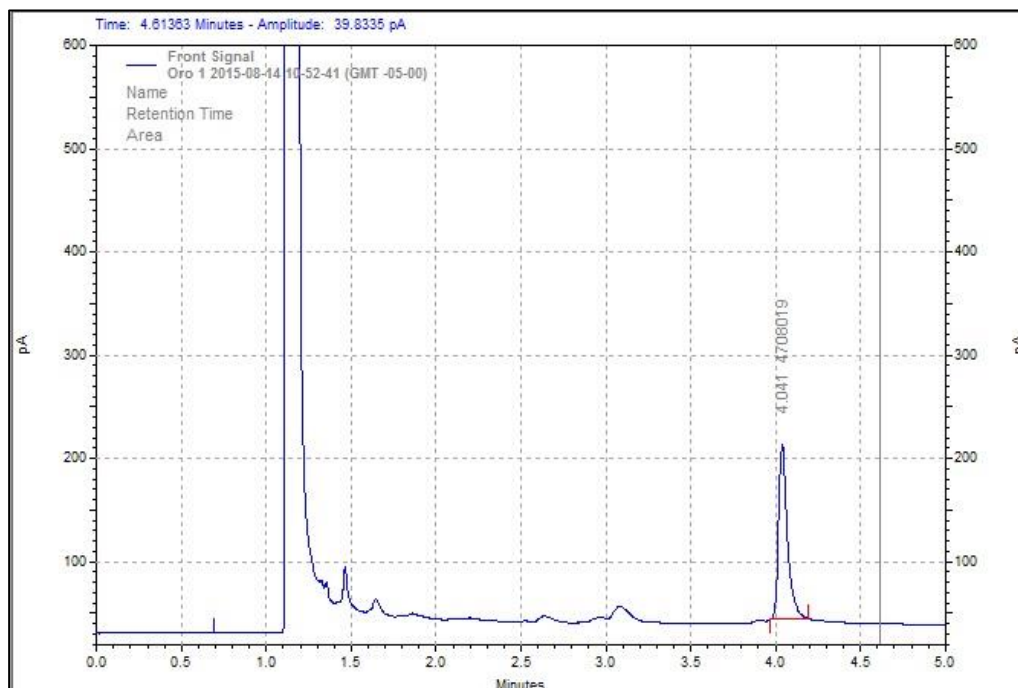


ANEXO 6.5. Estándar de 2800 mg/L.

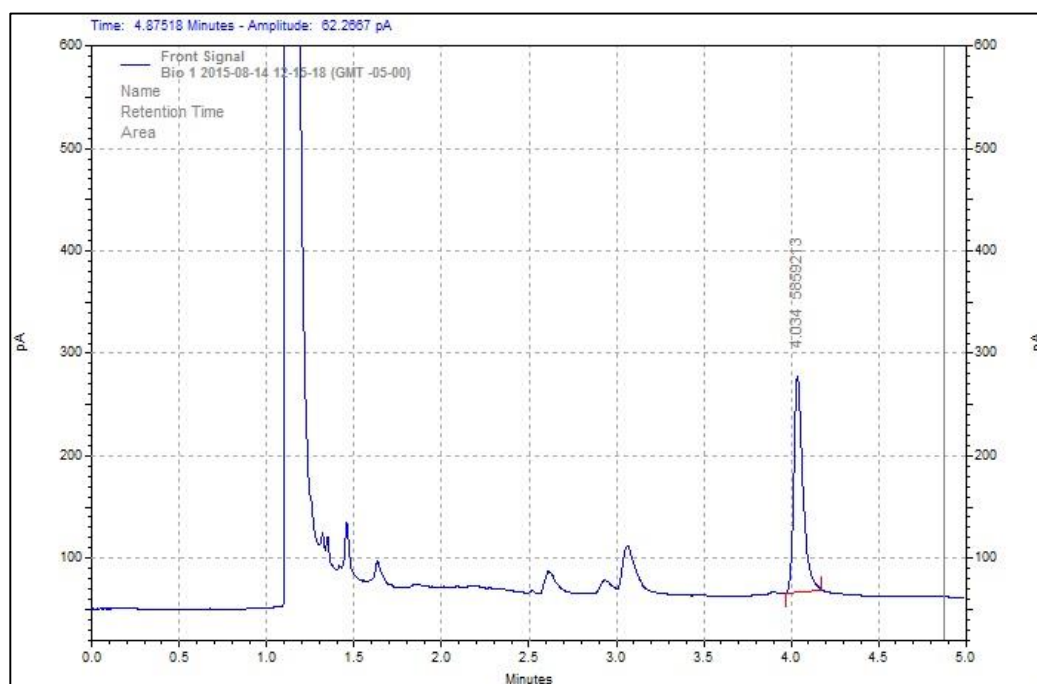


ANEXO 7. CROMATOGRAMAS DE LAS MUESTRAS DE HUEVOS.

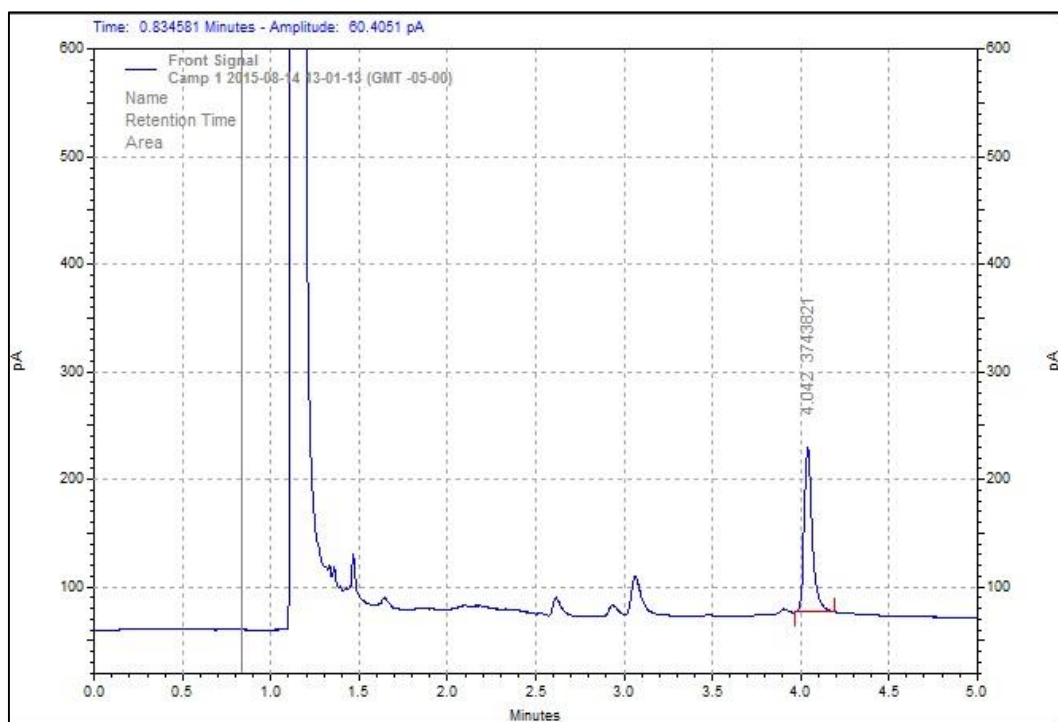
ANEXO 7.1. Cromatograma del colesterol presente en huevos ORO.



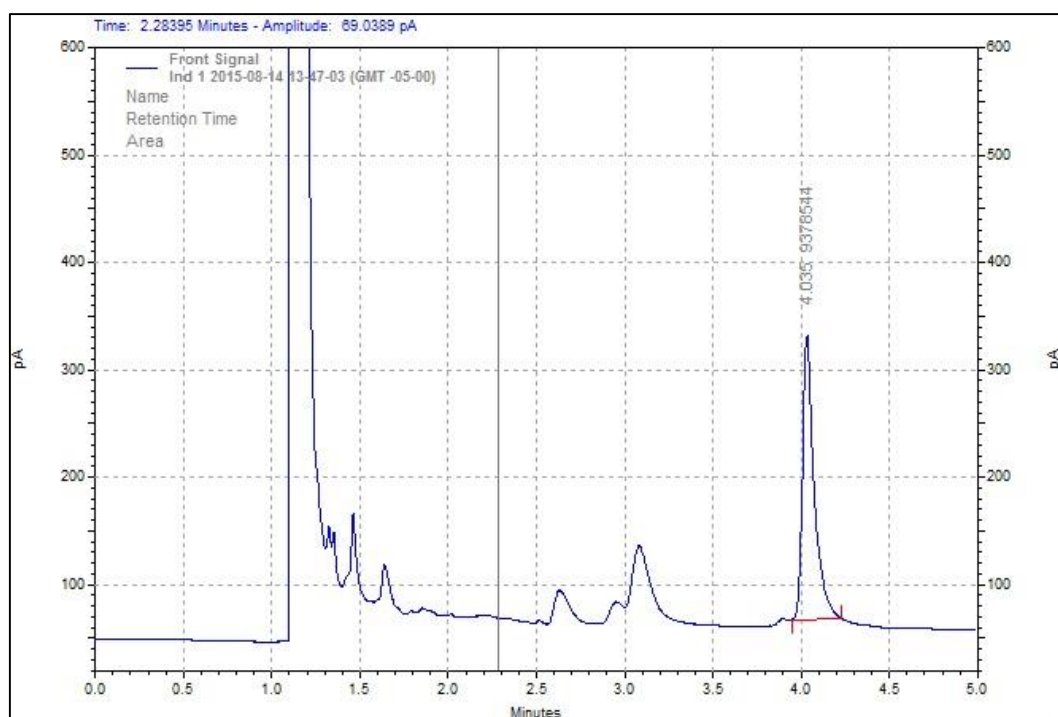
ANEXO 7.2. Cromatograma del colesterol presente en huevos BIO.



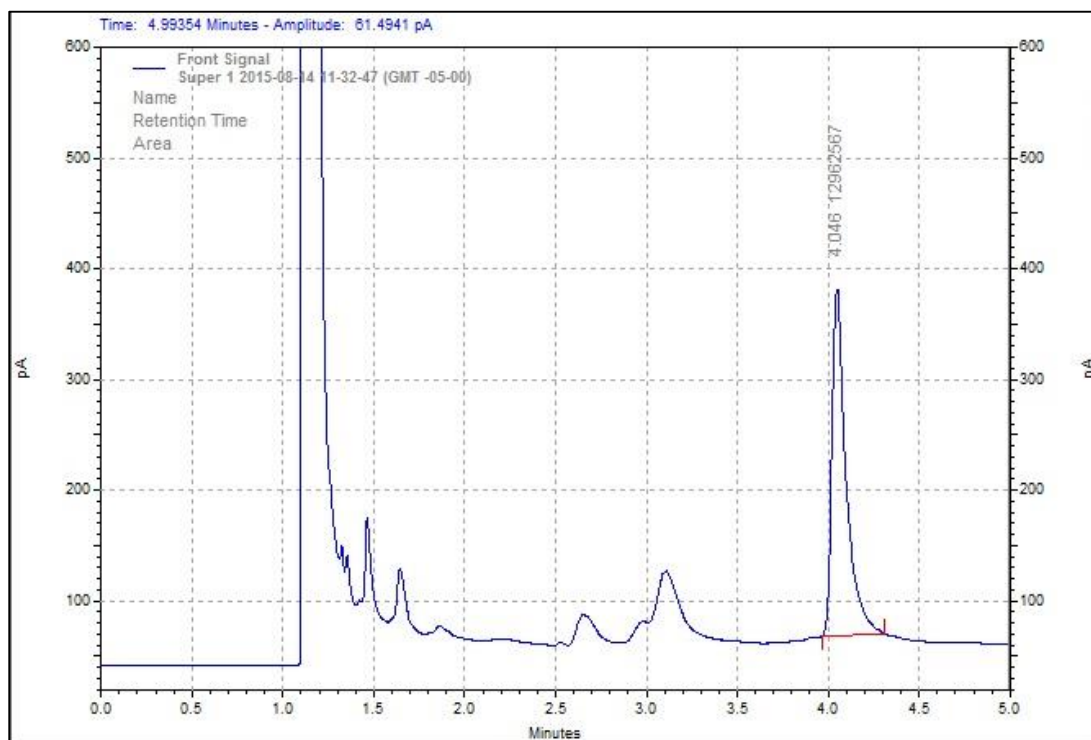
ANEXO 7.3. Cromatograma del colesterol presente en Huevos del Campo (PRONACA).



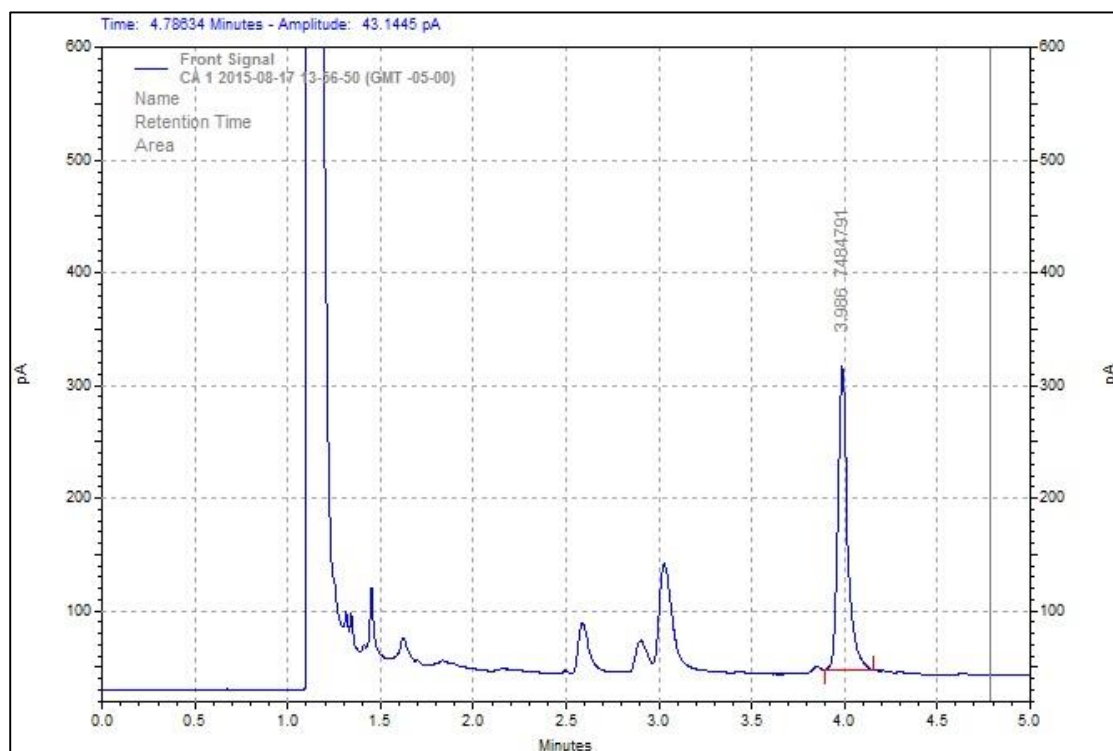
ANEXO 7.4. Cromatograma del colesterol presente en Huevos Indaves (PRONACA).



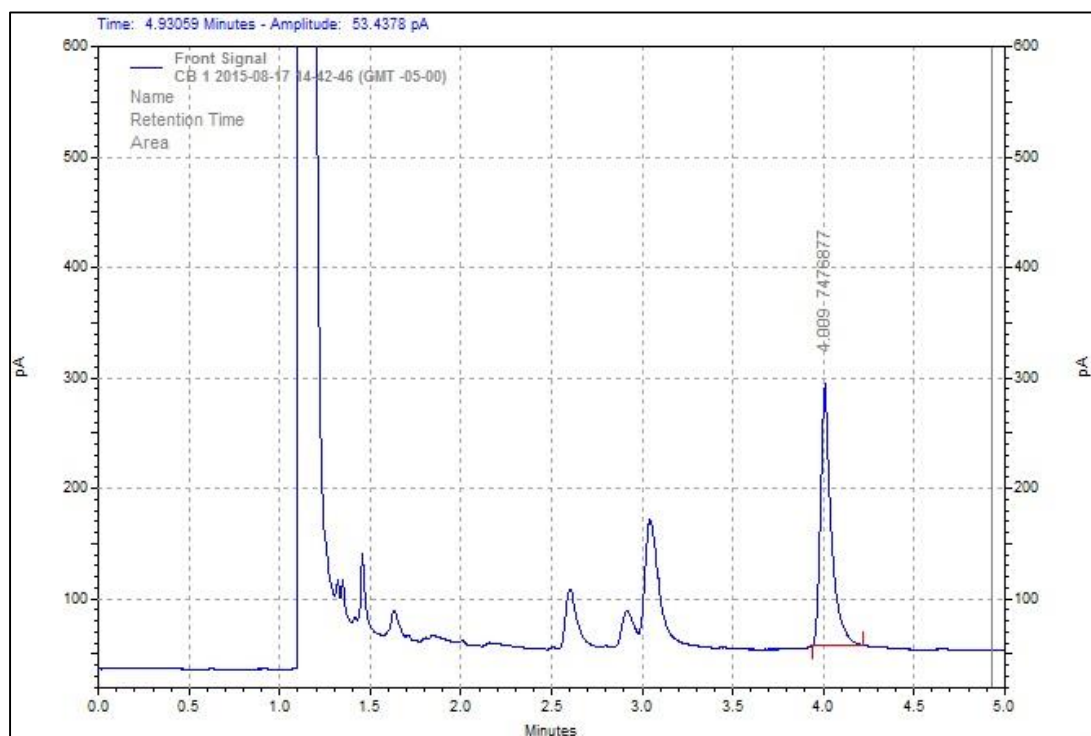
ANEXO 7.5. Cromatograma del colesterol presente en huevos Supermaxi.



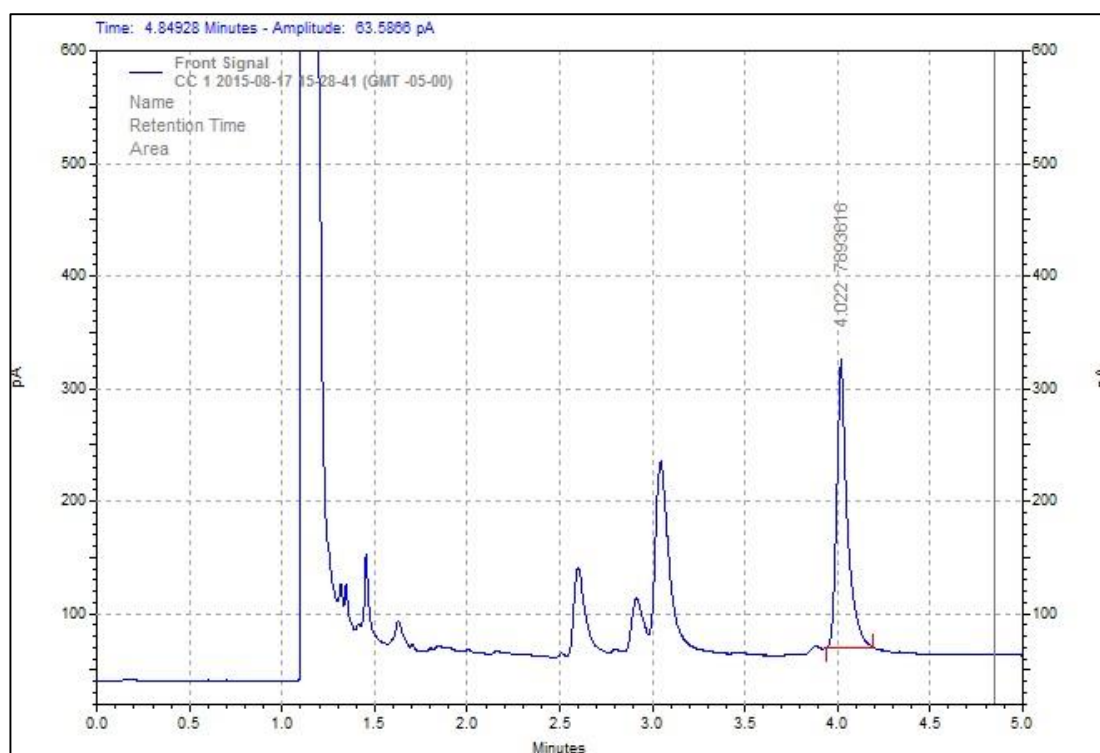
ANEXO 7.6. Cromatograma del colesterol presente en huevos Criollos A.



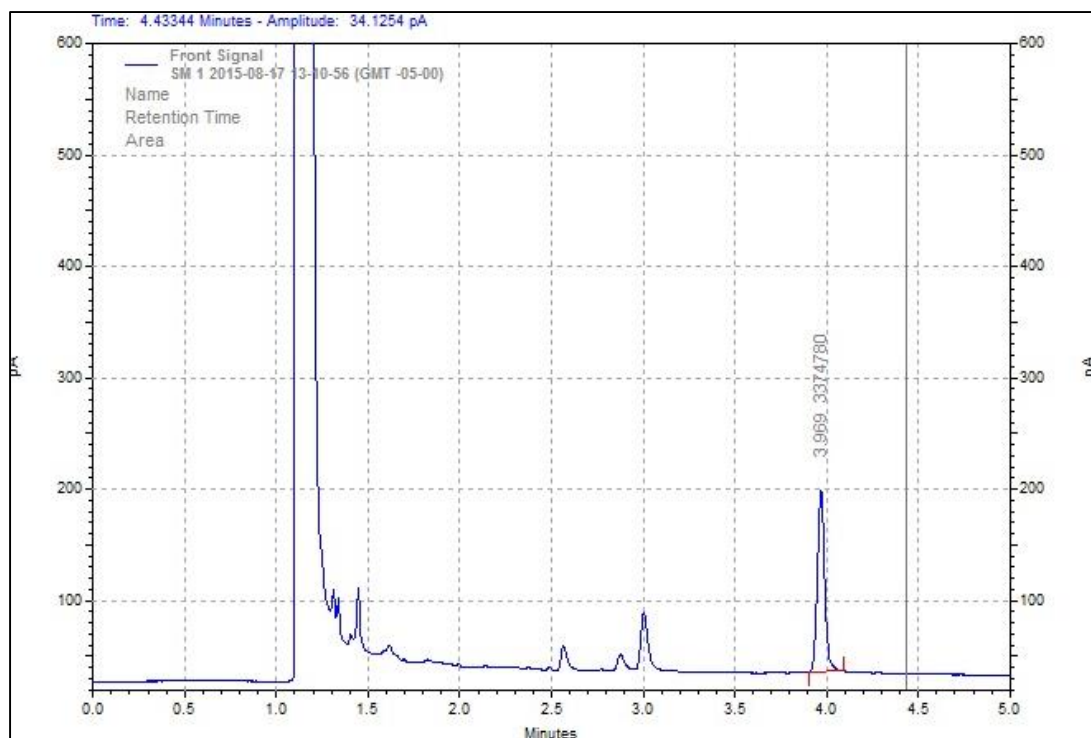
ANEXO 7.8. Cromatograma del colesterol presente en huevos Criollos B



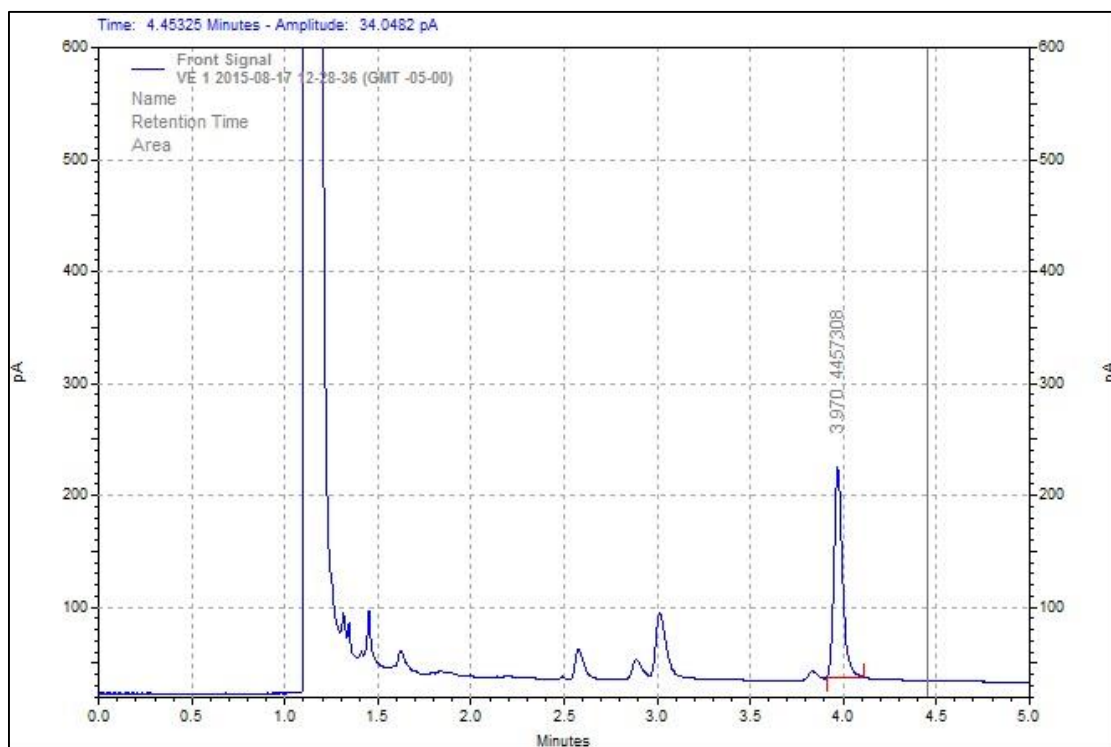
ANEXO 7.9. Cromatograma del colesterol presente en huevos Criollos C.



ANEXO 7.10. Cromatograma del colesterol presente en huevos Santa María.

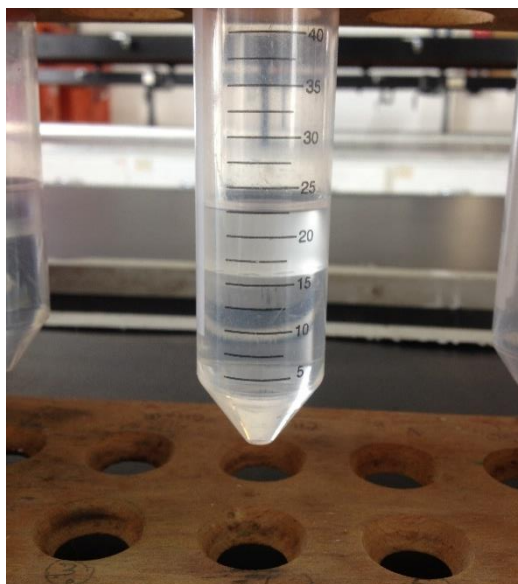


ANEXO 7.11. Cromatograma del colesterol presente en huevos Indaves con Omega 3 y Vitamina E.



ANEXO 8. FOTOGRAFÍAS DE LABORATORIO

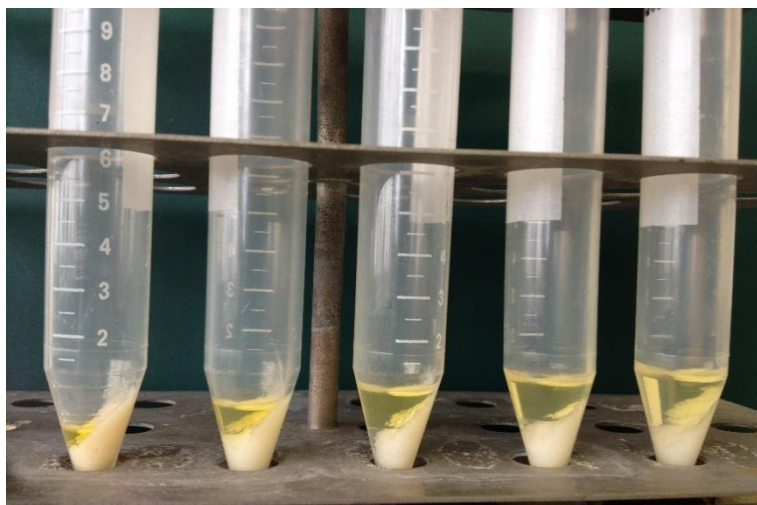
ANEXO 8.1. Solvente Supramolecular.



ANEXO 8.2. Disposición para la agitación en vórtex de la muestra.



ANEXO 8.3. Obtención de extracto supramolecular para diferentes muestras.



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Cinthya Pamela Delgado Sánchez, C.I. 0401670500 autora del trabajo de graduación intitulado: “Desarrollo de un método de extracción con Solventes Supramoleculares (SUPRAS) para la determinación de colesterol por Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Llama (GC-FID)”, previo a la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA** en la Facultad de **Ciencias Exactas y Naturales**:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 23 de Noviembre 2015